

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Perfil temporal de la neurogénesis tras un ictus isquémico
experimental: implicación de TLR4**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Palma Tortosa

Directores

Ignacio Lizasoain Hernández

María Ángeles Moro Sánchez

Jesús Miguel Pradillo Justo

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Perfil temporal de la neurogénesis tras un ictus isquémico
experimental. Implicación de TLR4

TESIS DOCTORAL
SARA PALMA TORTOSA

Directores de Tesis

Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Jesús Miguel Pradillo Justo

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



Perfil temporal de la neurogénesis tras un ictus isquémico
experimental. Implicación de TLR4

TESIS DOCTORAL

SARA PALMA TORTOSA

Madrid, 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi directores de tesis: Nacho, María Ángeles y Jesús, el haberme permitido realizar el doctorado en un grupo de investigación con tanto potencial y en el que he podido formarme como investigadora y como persona rodeada de gente muy válida y lo más importante, de muy buenas personas. Muchas gracias por vuestra paciencia a los tres y por haberme transmitido vuestro amor por la ciencia.

En segundo lugar, y no menos importante, muchísimas gracias a mi familia: a mis padres, que a la vez han hecho de psicólogos cuándo me estresaba y me costaba avanzar. Por cierto, ahora mi madre sabe más neurogénesis que nadie en el mundo de tanto escucharme... a Rubén, Paqui, José, Félix... Gracias a todos vosotros he sobrevivido a esta época, os quiero mucho, mucho, mucho a todos. Y, por supuesto, a mis tres cocos más bonitas del mundo que me alegran la existencia, Vera, Estela y Jara.

Hablando de familia, qué decir de esas dos personillas que me han acompañado prácticamente toda mi vida, mis Amparos, mis mejores amigas, mis cuasi-hermanas. No podría haber hecho la tesis (ni sobrevivir en general) sin teneros a mi lado, Pilarín y Ainho.

No me olvido ni mucho menos de la gente con la que empezó toda esta aventura.... Mis amigos de la carrera... Esos químicos/bioquímicos con los que he compartido tantas y tantas horas de biblioteca (aunque la mayor parte del tiempo estuviésemos moñeando y riéndonos de todo, hasta de lo más absurdo). Muchísimas gracias por estar a mi lado también en esta etapa, Jaime, Antonio, Sergio, Mario, Gong, Alicia, Alberto, Diego, Iván, Ana V, Marina (tú sí que tienes mérito, mi queridísima compi de piso, mil gracias por todo). A mis “para-lelas” Palomein y Amaia.

A mis queridos “UINitas”. A Violeta M, Isa, Carol, Alberto, Violeta D, Juanillo, Maribel, Raquel, Oli y Lidia, a toda esa cuadrilla isquémica. Muchísimas, pero muchísimas gracias a cada uno de vosotros, por vuestra ayuda y por los grandes momentos que me habéis hecho pasar en las largas horas de trabajo.

A Ali, hemos sobrevivido... Parecía imposible hace unos meses, pero con tu ayuda ha sido mucho más sencillo, mil gracias mi “compi” de tesis. A Ana, la jefa “tolai” (suena a nombre indio) que fue la primera en “presentarme” el labo y a TLR4, gracias.

Y, por supuesto, a todo el departamento de Farmacología en general, a esos becarios piña, sois la alegría de este trabajo y fuera de él (Aline, David, Ursulix, Karina, Mery, Marcos, Dani, Pablo, Caso et al, Borja....). A Fer, María Luisa, María Elena, MJ Alfaro, Manolo... Que siempre han estado ahí para echar una mano cuándo lo necesitaba. A Manoli, por ser la alegría viviente. Y, por supuesto, a los “resonancios”, David (a los dos), Palmira, Marién y JuanMa, por toda la ayuda que me han prestado.

A los excompañeros de laboratorio con los que tuve la enorme suerte de cruzarme, a los que ahora considero unos grandísimos amigos, con quien espero seguir pasando tan buenos ratos durante muchísimo tiempo, y que a su paso me han enseñado tanto, tanto a nivel científico como en la vida: Mayka, Maki, Roberto, Isaac, Víctor, David y Tam. Y por supuesto, también a Noe y a Jesús. Esta tesis la debo a vuestra ayuda y no voy de uno en uno pero todos sabéis de sobra lo muchísimo que significáis para mí. Sois los mejores ☺

Por último, dentro de esta gran experiencia me llevo otra que fue un gran cambio en mi vida. Mi estancia en Suecia con el Prof. Kokaia. Tengo tantos buenos recuerdos gracias, sobre todo, a la gente que me adoptó desde el primer momento, los españolitos por el mundo. Gracias Dani y Talía por haber ejercido de “papis” y por todo lo que hicisteis para que me sintiese como en casa; a mi “hermanita” y amiga, Ana, por haber hecho de la estancia una experiencia inolvidable, nos seguiremos encontrando, no lo dudes, muchísimas gracias por todo. También a Tania y Agi, que me recibieron con los brazos abiertos.

Y en general a todo el mundo que me ha rodeado y apoyado este tiempo, gracias a todos, y lo siento si me olvido de nombrar a alguno... Ni la tesis cura mi memoria pez, jeje.

¡¡¡MIL GRACIAS A TODOS!!!

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACC- Arteria Carótida Común	CXCR4- Receptor de quimioquina C-X-C tipo 4
ACM- Arteria Cerebral Media	DAMPs- Patrones Moleculares Asociados a Daño (<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>)
ADNc- Ácido Deoxirribonucleico complementario	DCX- Doblecortina
AIT- Ataque Isquémico Transitorio	ECV- Enfermedad Cerebrovascular
ANOVA- Análisis de la Varianza	EDTA- Ácido Etilendiaminotetraacético
AP-1- Proteína Adaptadora 1	EEM- Error Estándar de la Media
ARN- Ácido Ribonucleico	EGF- Factor de Crecimiento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ARNm- Ácido Ribonucleico Mensajero	EGFR- Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ATP- Adenosín Trifosfato	EMA- <i>European Medicines Agency</i>
BDNF- Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)	ERNs- Especies Reactivas de Nitrógeno
BHE- Barrera Hematoencefálica	EROs- Especies Reactivas de Oxígeno
BO- Bulbo Olfatorio	EtOH - Etanol
BrdU- 5-Bromo-2-deoxiuridina	FDA- <i>Food and Drug Administration</i>
CC- Cuerpo Caloso	FGF- Factor de Crecimiento de Fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factors</i>)
CD14- <i>Cluster</i> de Diferenciación 14	GAPDH- Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa
CMN- Célula Madre Neural (NSC- Neural Stem Cell)	GFAP- Proteína Ácida Fibrilar Glial (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
CO₂ - Dióxido de Carbono	HMGB1- Proteína de Alta Movilidad del Grupo <i>Box-1</i> (<i>High Mobility Group Box 1</i>)
COX2- Ciclooxygenasa tipo 2	
CPN- Célula Progenitora Neural (NPC- Neural Progenitor Cell)	
CTX- Corteza	

HSP60- Proteína de Choque Térmico 60
(*Heat-Shock Protein 60*)

HSP70- Proteína de Choque Térmico 70
(*Heat-Shock Protein 70*)

IFN- Interferón

IL-10- Interleuquina-10

IL-1 β - Interleuquina-1 beta

IL-6- Interleuquina 6

iNOS- Óxido Nítrico Sintasa inducible

IRF- Factor Regulador de Interferón
(*Interferon Regulatory Factor*)

IRM- Imagen de Resonancia Magnética

LBP- Proteína de Unión al Lipopolisacárido
(*Lipopolysaccharide-Binding Protein*)

LCR- Líquido Ceforraquídeo

LDH- Lactato Deshidrogenasa

LPS- Lipopolisacárido

Mash-1 o ASCL1- *Achaete-scute complex homolog 1*

MCA- Medio Condicionado de Astrocitos

MCP-1- Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MD-2- Factor de Diferenciación Mieloide-2

MEC- Matriz Extracelular

MMP- Metaloproteasa de Matriz

MyD88- Factor de Diferenciación Mieloide 88 (*Myeloid Differentiation Factor 88*)

NeuN- Núcleo de Neuronas (*Neuronal Nuclei*)

NK- *Natural Killer*

OMS- Organización Mundial de la Salud

PAMP- Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PBS- Tampón Fosfato Salino

PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PET- Tomografía de Emisión de Positrones
(*Positron Emission Tomography*)

PFA- Para-formaldehído

pHis3- Fosfo-Histona-3

PIP₂- Fosfatidil-inositol Difosfato

PIP₃- Fosfatidil-inositol Trifosfato

pMCAO- Oclusión Permanente de la Arteria Cerebral Media (*Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion*)

PRR- Receptores de Reconocimiento de Patrones

RAGE- Receptor for Advanced Glycation Endproducts

RMN- Resonancia Magnética Nuclear

RMR- Ruta Migratoria Rostral

r-tPA- Activador Tisular del Plasminógeno Recombinante

SDF-1 α - Factor Derivado de Células Estromales- 1 (*Stromal Cell-Derived Factor 1*)

SEN- Sociedad Española de Neurología

SNC- Sistema Nervioso Central

SNS- Sistema Nacional de Salud

TIR- Dominio del Receptor *Toll*/IL (*Toll*/IL
Receptor domain)

TIRAP- Proteína Asociada al Receptor
Toll/IL (*Toll*/IL *Receptor-Associated Protein*)

TLR- Receptores *Toll-like* (*Toll-like*
Receptors)

TNF- α - Factor de Necrosis Tumoral-
 α (Tumor Necrosis Factor- α)

TRAF- Factor Asociado al Receptor de TNF
(*TNFR Associated-Factor*)

TRAM- Molécula Adaptadora Relacionada
con TRIF (*TRIF-Related Adaptor Molecule*)

TRIF- Factor Derivado de Interferón
asociado al Receptor *Toll* (TIR-domain-
containing adapter-inducing interferon- β)

Tuj-1- β -Tubulina de clase III

VCAM-1- Molécula de Adhesión Vascular-1
(*Vascular Cell Adhesion Protein 1*)

VEGF- Factor de Crecimiento del Endotelio
Vascular (*Vascular Endothelial Growth*
Factor)

VL- Ventrículo Lateral

ZSG- Zona Subgranular (**SGZ**-Subgranular
Zone)

ZSV- Zona Subventricular (**SVZ**-
Subventricular Zone)

ÍNDICE

I.- RESUMEN.....	I
II.- SUMMARY	IX
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Enfermedad cerebrovascular.....	1
1.1.1.- Clasificación	3
1.1.2.- Ictus isquémico	4
1.1.3.- Cascada isquémica.....	5
1.1.4.- Tratamientos y estrategias terapéuticas. Neurorreparación	8
1.2.- Neurogénesis adulta. Etapas y regulación.....	11
1.2.1.- Proliferación en la zona subventricular	14
1.2.2.- Migración de neuroblastos a través de la ruta migratoria rostral.....	15
1.2.3.- Diferenciación neuronal en el bulbo olfatorio.....	16
1.3.- Neurogénesis e ictus.....	16
1.3.1.- Regulación de la neurogénesis tras ictus	16
1.3.1.1.- Proliferación tras isquemia.....	17
1.3.1.2.- Migración ectópica de neuroblastos	17
1.3.1.3.- Diferenciación neuronal en el área dañada	20
1.3.2.- Neurogénesis e inflamación.....	20
1.4.- Implicación de TLR4 en neurogénesis tras ictus	21
1.4.1.- El sistema inmune innato y los receptores de reconocimiento de patrones.....	21
1.4.2.- Receptores Toll-like (<i>Toll-like Receptors</i> ; TLRs)	22
1.4.3.- Vías de señalización mediadas por los TLRs	23
1.4.4.- <i>Toll-like receptor 4</i> (TLR4)	25
1.4.5.- TLR4 e ictus	28
1.4.6.- TLR4 en neurogénesis tras ictus	29
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
2.1.- Justificación	35

2.2.- Hipótesis	35
2.3.- Objetivos	36
2.3.1.- Estudio del perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV tras una isquemia cortical experimental en ratón.....	36
2.3.2.- Estudio del papel de TLR4 en procesos de neuroreparación tras una isquemia experimental.	36
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1.- Materiales	39
3.2.- Modelos experimentales <i>in vivo</i> . Procesos quirúrgicos	39
3.2.1.- Animales de experimentación	39
3.2.2.- Anestesia y control de los animales.....	40
3.2.3.- Modelo de isquemia cerebral focal en ratón por ligadura	40
3.2.4.- Cuantificación del volumen de infarto	41
3.2.5.- Extracción de plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR). Análisis de pH y composición mediante estudios de RMN-metabólica	43
3.3.- Modelos experimentales <i>in vitro</i> . Cultivos celulares	44
3.3.1.- Aislamiento, cultivo primario y expansión de neuroesferas de ratón adulto de la ZSV	44
3.3.2.- Aislamiento y cultivo primario de astrocitos corticales de ratón neonato	45
3.3.3.- Estudio de la viabilidad celular en los cultivos celulares	46
3.4.- Estudios de proliferación <i>in vivo</i> . Aislamiento y caracterización de células madre y progenitoras neurales en la ZSV	47
3.4.1.- Cuantificación de células en fase proliferativa en la ZSV	47
3.4.2.- Disgregación mecánica y enzimática y tratamiento de la suspensión celular para citometría	49
3.4.3.- Análisis de células madre y progenitoras neurales (CMNs y CPNs) por citometría de flujo	50
3.5.- Estudios de proliferación <i>in vitro</i>	51
3.6.- Estudios de migración <i>in vivo</i>	51
3.6.1.- Análisis densitométrico de la ruta migratoria de neuroblastos a partir de imágenes de microscopía confocal.....	51

3.6.2.- Aislamiento y extracción de ARN de corteza cerebral.....	53
3.6.3.- Análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR.....	53
3.7.- Estudios de migración in vitro.....	54
3.7.1.- Sistema Transwell®	54
Immunocitoquímica con Tuj-1 y TOPRO-3	56
Cuantificación celular	57
3.7.2.- Análisis de expresión de mediadores neurogénicos	57
Tratamiento de astrocitos con ligandos de TLR4.....	57
Extracción de ARN de astrocitos y análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR ...	57
3.8.- Estudio de diferenciación <i>in vivo</i>.....	57
Contaje de células BrdU ⁺ /NeuN ⁺ en corteza ipsilesional mediante microscopía confocal	57
3.9.- Análisis estadístico.....	59
4.- RESULTADOS	63
4.1.- RESULTADOS BLOQUE I: Perfil temporal de la neurogénesis cortical tras una isquemia cerebral experimental.....	63
4.1.1.- Diseño experimental y tamaño de infarto	63
4.1.2.- Perfil temporal de la proliferación en la ZSV.....	65
4.1.2.1.- Medida de pH en plasma y LCR y análisis de la composición del LCR en fase aguda de la isquemia	67
4.1.3.- Perfil temporal de la migración eutópica de neuroblastos	69
4.1.4.- Perfil temporal de la migración de neuroblastos hacia el área isquémica.....	70
4.1.4.1.- Migración ectópica de neuroblastos a través de la zona rostral.....	70
4.1.4.2.- Migración ectópica de neuroblastos a través de la zona caudal	73
4.1.5.- Estudio de la diferenciación neuronal en la corteza peri-infarto	74
4.2.- RESULTADOS BLOQUE II: Papel de TLR4 en procesos de neuroreparación en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental	77
4.2.1.- Efecto de TLR4 en la evolución del infarto cerebral	77
4.2.2.- Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV tras una isquemia cortical.....	79

4.2.2.1.- Efecto de TLR4 en el estado proliferativo de la ZSV en condiciones basales y tras isquemia experimental <i>in vivo</i>	79
4.2.2.2.- Efecto de la activación de TLR4 en CMNs de ratón adulto <i>in vitro</i>	82
4.2.2.3.- Efecto de TLR4 en las poblaciones de CMN y CPN de la ZSV <i>in vivo</i>	83
4.2.3.- Efecto de TLR4 en la migración eutópica y ectópica de neuroblastos tras una isquemia cortical.....	86
4.2.3.1.- Efecto de TLR4 en la migración eutópica de neuroblastos hacia el BO	86
4.2.3.2.- Efecto de TLR4 sobre la expresión de mediadores neurogénicos en la corteza peri-infarto	87
4.2.4.- Efecto de la modulación farmacológica de TLR4 en la expresión de mediadores neurogénicos en cultivo de astrocitos	92
4.2.5.- Efecto de la activación de TLR4 sobre la migración de neuroblastos <i>in vitro</i>	94
4.2.5.1.- Puesta a punto del ensayo de migración de neuroblastos <i>in vitro</i>	95
4.2.5.2.- Efecto de LPS sobre la migración <i>in vitro</i> de neuroblastos	96
4.2.5.3.- Efecto de HMGB1 sobre la migración <i>in vitro</i> de neuroblastos	98
5.- DISCUSIÓN.....	103
BLOQUE I: Perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental	103
BLOQUE II: Papel de TLR4 en procesos de neurorreparación en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental.....	110
6.- CONCLUSIONES	127
7.- CONCLUSIONS	131
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	135
9.-ANEXO.....	147
Índice de figuras	147
Índice de tablas	150

I.- RESUMEN

I.- RESUMEN

La isquemia cerebral o ictus es una de las principales causas de muerte en países desarrollados así como la primera causa de discapacidad en mayores de 65 años (Sousa et al., 2009). Asimismo, entre los pacientes que sobreviven a un infarto cerebral, una gran parte suelen desarrollar una serie de secuelas como son demencia, afasia, hemiparesia o algún grado de dependencia (Kalaria et al., 2016; Kelly-Hayes et al., 2003). Debido a lo anterior, el ictus supone un gran gasto socioeconómico, lo que hace necesario obtener avances en prevención y tratamiento de la enfermedad.

El ictus se puede clasificar, según su naturaleza, en isquémico (mayoritario, un 85% de los casos) y hemorrágico (15% de los casos). Desde el punto de vista mecanístico, el ictus isquémico se produce por la oclusión de una arteria cerebral, dando lugar a una falta de aporte sanguíneo focal que causa un daño irreversible en un área delimitada denominada *core*, que corresponde a la zona más afectada, y un daño parcialmente reversible, denominada área de penumbra, la cual, si se consigue restaurar el flujo sanguíneo, será susceptible de recuperación (Astrup et al., 1977; Astrup et al., 1981). Como consecuencia de la reducción, total o parcial, del flujo sanguíneo cerebral, la llegada de oxígeno y glucosa a las células del área irrigada por el vaso ocluido se ve comprometida, induciéndose una serie de procesos bioquímicos conocidos como cascada isquémica que lleva, entre muchos otros eventos, a una desviación del metabolismo de la glucosa a la vía anaerobia debido a la reducción de la disponibilidad de oxígeno, lo que lleva a un incremento de ácido láctico y a la consiguiente acidosis.

Actualmente, los únicos tratamientos aprobados para el ictus se reducen a la eliminación mecánica del trombo por medio de una trombectomía, y a la disolución del mismo mediante trombolisis utilizando el único tratamiento farmacológico aprobado por la FDA y la EMA, el r-tPA (Activador tisular del Plasminógeno recombinante). Este tratamiento, sin embargo, tiene unos criterios de inclusión muy restrictivos y un elevado riesgo de producir transformación hemorrágica por lo que únicamente una media del 5% de los pacientes pueden llegar a beneficiarse del mismo (Larrue et al., 2001; McArthur et al., 2011). Debido a esto, es de gran importancia el desarrollo de nuevas terapias tanto neuroprotectoras, enfocadas a la fase aguda de la enfermedad, como

neurorreparadoras, enfocadas a la fase crónica de la misma, para ir más allá en el tratamiento de esta patología.

Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan la idea de que el cerebro adulto, tras un ictus isquémico, activa una serie de mecanismos neurorreparadores que tienen como finalidad su propia regeneración mediante la producción de nuevas neuronas en áreas del cerebro en las cuales la neurogénesis no se produce en condiciones fisiológicas. Así, tras un ictus isquémico ha sido descrito un incremento de la proliferación de los progenitores neurales presentes en los dos nichos neurogénicos que permanecen activos en el cerebro adulto, la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral (Zhang et al., 2001) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (Arvidsson et al., 2001). Además, parte de los neuroblastos generados en estos nichos, fundamentalmente en la ZSV, se ven redirigidos desde su ruta predefinida, la ruta migratoria rostral (RMR), hacia el área lesionada, en lo que se denomina migración ectópica (Ohab and Carmichael, 2008). A pesar de los datos esperanzadores previos, son muy pocos los progenitores neurales que consiguen alcanzar el área lesionada y menos aun los que consiguen madurar y convertirse en una neurona funcional por lo que, a pesar de que pueda ejercer una mejora sobre el pronóstico funcional de paciente, esta neurogénesis es insuficiente para reparar el área dañada y compensar los déficits neurológicos que la enfermedad conlleva (Lindvall and Kokaia, 2015).

Tras un daño isquémico, las células del área afectada van a liberar moléculas, denominadas *DAMPs* o patrones moleculares asociados a daño, que son reconocidas por receptores presentes en las células del sistema inmune innato, denominados PRRs o receptores de reconocimiento de patrones, iniciando una respuesta ante la situación generada. En los últimos años, se han publicado algunos estudios que demuestran que TLR4, receptor perteneciente a la familia de los PRRs, tiene un papel dual tras una isquemia cerebral: por un lado, está implicado en el inicio y la exacerbación del daño tisular en la fase aguda de la enfermedad (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007) y, por otro, en procesos de neurorregeneración en la fase crónica de la misma (Moraga et al., 2014).

A partir de los antecedentes citados, establecimos la siguiente **hipótesis**:

Las tres fases principales de la neurogénesis, proliferación, migración y diferenciación, se ven modificadas a lo largo del tiempo tras un ictus isquémico cortical, lo que culmina en la integración de nuevas neuronas en el área dañada. Asimismo, el receptor TLR4 está implicado en la neurogénesis inducida tras un ictus isquémico, tanto a nivel de la proliferación en la ZSV como en la migración eutópica y ectópica de los neuroblastos.

Con objeto de demostrar esta hipótesis se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Estudio del perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV tras una isquemia cortical experimental en ratón.
2. Estudio del papel de TLR4 en procesos de neuroreparación tras una isquemia experimental mediante el análisis de la proliferación en la ZSV y de la migración eutópica y ectópica de neuroblastos en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Para poder desarrollar nuestros objetivos realizamos como modelo de isquemia cortical en ratón una oclusión permanente de la arteria cerebral media (ACM) mediante ligadura (Chen et al., 1986), en animales C57BL/6 (Bloque I) y animales C57BL/10J (TLR4^{+/+}) y C57BL/10ScNJ (TLR4^{-/-}) (Bloque II). Para comprobar parte de los resultados obtenidos *in vivo* y estudiar los mecanismos y la implicación de distintos tipos celulares en los procesos estudiados, empleamos modelos *in vitro*, utilizando cultivos celulares de astrocitos y células madre neurales, ambos de ratón.

Los resultados obtenidos respecto al primer objetivo muestran, tras una isquemia experimental cortical, una disminución del número de células proliferando en la fase aguda de la misma, que coincide en el tiempo con una acidificación tanto del plasma sanguíneo como del líquido cefalorraquídeo, así como con un incremento de la migración de los neuroblastos a través de su ruta eutópica. Tras una normalización de los niveles, tanto de proliferación como de dicha migración, observamos a los 14 días un incremento del número de células proliferando, coincidente con un aumento unilateral de la migración ectópica de los neuroblastos al área dañada en la zona caudal del cerebro. A los 28 días tras la isquemia se observa, por un lado, un mayor incremento de la migración ectópica, en este caso tanto en la zona caudal como rostral (existiendo en

esta última una mayor distancia a recorrer por los neuroblastos desde la ZSV hasta la corteza) así como, de nuevo, una disminución del número de células proliferando en la ZSV respecto a los niveles basales. Es destacable que todos los cambios observados en la proliferación en la ZSV son bilaterales, por lo que posiblemente sean debidos a modificaciones en la composición del LCR. Por último, el marcaje mediante incorporación de BrdU de las células que proliferan entre los días 7 y 21 tras isquemia (tiempo entre el cual se encuentra el pico de máxima proliferación en dicho nicho neurogénico) puso de manifiesto que éstas son capaces de diferenciarse a progenitores y alcanzar la corteza, donde van a madurar y a sobrevivir a largo plazo (tiempo analizado de 65 días tras isquemia) como neuronas previsiblemente funcionales.

Por otro lado, los resultados obtenidos respecto al segundo objetivo demuestran que TLR4 es necesario para una mejor resolución del área infartada en la fase crónica de la isquemia cerebral. Asimismo, respecto al papel de este receptor en neurogénesis, el estudio del efecto que desempeña en condiciones no isquémicas reiteró que TLR4 tiene un papel inhibitor en el número de células proliferando en la ZSV, lo que se traduce, en consecuencia, en un menor número de neuroblastos migrando a través de la RMR (migración eutópica). Asimismo, el estudio de las poblaciones neurales demostró la ausencia de cambios, en condiciones basales, en el total de células madre neurales (CMNs) y células progenitoras neurales (CPNs), así como en el estado proliferativo de las mismas, sin mostrar tampoco cambios en el porcentaje de células de tipo B activadas ni de células de tipo C. Respecto al papel de TLR4 en la fase aguda de la isquemia, hemos demostrado que la disminución observada previamente está parcialmente compensada en los animales que expresan TLR4, existiendo en estas condiciones un mayor número de células proliferando. Estos resultados fueron corroborados mediante experimentos *in vitro* con DAMPs cuya liberación tras isquemia ha sido descrita. En el análisis de las poblaciones neurales, en la fase aguda de la isquemia, como en situación fisiológica, no existen diferencias en el total de la mismas así como en el porcentaje de CMNs y CPNs quiescentes; sin embargo, sí se demostró una disminución del porcentaje de CMNs y CPNs proliferativas, de acuerdo con el resultado previo. Además, respecto a las principales poblaciones neurales, TLR4 está implicado en el mantenimiento, en la fase aguda de la isquemia, de un mayor número de células de tipo B activadas en la ZSV, así como en la disminución de las células de tipo C en comparación con la situación basal. El análisis de la migración eutópica, por

otro lado, recalcó el incremento en la fase aguda observado previamente en los animales *wildtype*, mientras que, en los animales deficientes en TLR4, esta migración no se ve modificada, lo que indica que TLR4, en la fase aguda de la isquemia, es necesario para facilitar un incremento transitorio de la migración eutópica de neuroblastos. En el estudio de la fase crónica de la isquemia, TLR4 vuelve a ejercer un papel inhibidor de la proliferación, al igual que se observaba en una situación fisiológica. La bilateralidad en la proliferación en la ZSV descrita para los animales *wildtype* sigue observándose en los animales deficientes en TLR4, lo que refuerza la hipótesis de que los cambios en este parámetro son debidos a modificaciones en la composición de LCR, líquido en contacto directo con ambos ventrículos.

Los análisis restantes se enfocaron en el estudio de los mecanismos implicados en el retraso en la migración ectópica en los animales deficientes en TLR4, evento descrito en la bibliografía (Moraga et al., 2014). Nuestros resultados demuestran que la deficiencia de TLR4 está implicada en un retraso en la resolución de la inflamación en la zona de daño, estudiada mediante los cambios temporales de la expresión de moléculas pro-inflamatorias como la IL-6, MCP-1 o IL-1 β en la corteza peri-infarto. Asimismo, moléculas implicadas en la potenciación de la migración de neuroblastos, como SDF-1 α y BDNF, ven retrasada su expresión en el tiempo como consecuencia de la deficiencia del receptor. También hemos demostrado la implicación de los astrocitos en este proceso, tanto mediante un aumento de la expresión de mediadores neurogénicos debido de la activación específica de TLR4, como analizando su implicación en la tasa de migración de neuroblastos empleando sistemas de migración *in vitro*. Igualmente, hemos observado que la activación de TLR4, tanto mediante el tratamiento con PAMPs (LPS) como con DAMPs (HMGB1) sobre la propia CMN, induce sobre ésta una diferenciación a neuroblasto y la activación de su potencial migratorio.

En resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han demostrado que, tras una isquemia experimental, las distintas fases de la neurogénesis van a verse modificadas a lo largo del tiempo, lo que nos indica que conocer en qué momento de la enfermedad es más beneficioso potenciar cada una de la fases es de gran importancia en vistas a obtener un mayor número de nuevas neuronas funcionales en la corteza infartada que permitan una mejor recuperación del paciente reduciendo en lo posible los déficits neurológicos asociados a esta enfermedad. Además, los estudios realizados

demuestran la importancia de TLR4 como diana terapéutica para potenciar la neurogénesis tras un ictus isquémico, por un lado, impulsando el proceso de proliferación y, por otro lado, como modulador positivo de la migración ectópica de neuroblastos.

II.- SUMMARY

II.- SUMMARY

Cerebral ischemia, also known as stroke, is one of the leading causes of death in developed countries and the first cause of disability in elderly people. Moreover, the majority of surviving stroke patients may develop sequels as dementia, aphasia, hemiparesis or some dependence degree (Kalaria et al., 2016; Kelly-Hayes et al., 2003). Assuming those facts, stroke represents a huge socioeconomic burden revealing the necessity to improve prevention strategies and disease treatments.

According to its nature, a stroke can be classified into ischemic stroke (85%) or hemorrhagic stroke (15%). From the mechanical point of view, ischemic stroke is caused by the occlusion of a cerebral artery. That insult results in a focal ischemic process that causes irreversible damage in a delimited area called core, which corresponds to the most affected area; and a partially reversible damage, called penumbra area, where, if blood flow is restored, there could be some recovery (Astrup et al., 1977; Astrup et al., 1981). As a consequence of the total or partial reduction of cerebral blood flow, the oxygen and glucose input is compromised. This situation induces a series of biochemical processes known as ischemic cascade, leading to a deviation of glucose metabolism to an anaerobic pathway due to the reduced oxygen availability. This scenario promotes an increase in lactic acid and the consequent acidosis.

Nowadays, the only approved treatments for stroke are limited to the mechanical thrombus removal by thrombectomy and the thrombus dissolution by thrombolysis. Thrombus dissolution is achieved by the administration of the only FDA-approved pharmacological treatment (r-tPA, recombinant Plasminogen Tissue Activator). Nevertheless, this treatment has a very restrictive inclusion criteria and a high risk of hemorrhagic transformation. That implies that only an average of 5% of patients can benefit from it (Larrue et al., 2001; McArthur et al., 2011).

According to this, the development of new neuroprotective (focusing on the acute phase) and neuroregenerative (focusing on the chronic phase) therapies is critical to go further in the treatment of this pathology.

There are numerous experimental evidences that support the idea that after a cerebral damage the adult brain activates a series of neurorepair mechanisms. Its aim is to regenerate the damaged area by the production of new neurons in areas in which

neurogenesis does not occur in physiological conditions, such as striatum or cerebral cortex.

In this context, after an ischemic stroke, it has been described that there is an increase in the proliferation of neural progenitors present in the two neurogenic niches that remain active in the adult brain, the subventricular zone (SVZ) along the lateral ventricle (Zhang et al., 2001) and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (Arvidsson et al., 2001). In addition, a portion of the neuroblasts generated in these niches (mainly in the SVZ) are redirected from their eutopic migration through the rostral migratory stream to the ischemic boundary region, an event called ectopic migration (Ohab and Carmichael, 2008). In spite of the previous encouraging data, there are very few neural progenitors that manage to reach the injured area and are even fewer those who manage to mature and become a functional neuron. Therefore, despite an improvement in the functional prognosis of stroke patients, this neurogenesis is insufficient to repair the damaged area and compensate for the neurological deficits that the disease entails (Lindvall and Kokaia, 2015).

After an ischemic insult, some molecules called DAMPs or damage-associated molecular patterns will be released by the cells in the affected area. Those patterns are recognised by receptors present in the innate immune system cells, called PRRs or pattern recognition receptors, initiating a response against the situation generated. In recent years, some studies have shown that TLR4, a receptor belonging to PRRs family, plays a dual role after cerebral ischemia. On the one hand, it seems to be involved in the exacerbation of tissue damage in the acute phase of the disease (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007) and on the other hand, it is involved in neuroregeneration processes in the chronic phase of the disease (Moraga et al., 2014).

Assuming those antecedents, we have established the following hypothesis: the three main phases of neurogenesis, which are proliferation, migration and differentiation, are modified over time after a cortical ischemic stroke. Those alterations culminate with the integration of new neurons into the damaged area. Likewise, TLR4 is involved in the neurogenesis process induced after an ischemic stroke, both at the level of proliferation in the SVZ and in a eutopic and a ectopic migration of neuroblasts.

In order to demonstrate this hypothesis, the following objectives were proposed:

1. Study of the neurogenesis temporal profile in SVZ after an experimental cortical ischemia in mice.

2. Study of the role of TLR4 in neurorepair processes after cerebral ischemia by the analysis of proliferation in the SVZ and the study of eutopic and ectopic neuroblast migration in experimental models *in vitro* and *in vivo*.

In order to develop our objectives, a permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) by ligation was performed as a model of cortical ischemia (Chen et al., 1986) in C57BL/6 mice (Part I) and, C57BL/10J (TLR4+/+) and C57BL/10ScNJ (TLR4-/-) mice (Part II). To verify some of the results obtained *in vivo* and to study the mechanisms and the implication of different cell types in the studied processes, we used *in vitro* models, using mice astrocytes and mice neural stem cell cultures.

Our results regarding the first objective show, in the acute phase of an experimental cortical ischemia, a decrease in the number of proliferating cells. That coincides in time with an acidification of both blood plasma and cerebrospinal fluid, as well as an increase of eutopic neuroblast migration. After normalisation of both proliferation and migration levels, we observed a 14-day (chronic) increase in the number of proliferating cells, coinciding with a unilateral increase in the ectopic neuroblast migration to the damaged area in the caudal area of the brain. There are two different processes occurring 28-days after ischemia. On the one hand, there is a greater increase of ectopic migration, both in the caudal and rostral areas (in the rostral area, neuroblasts need to go through bigger distances from the SVZ to the cortex) and also there is a decrease in the number of proliferating cells in the SVZ relative to basal levels. It is noteworthy that all the observed changes in proliferation in the SVZ are bilateral and may be due to changes in the composition of the CSF. Finally, labeling the proliferating cells by BrdU incorporation between days 7 and 21 after ischemia (period of time when the peak of maximum proliferation in the SVZ occurs) allowed to see that they are able to differentiate themselves into progenitors and reach the cortex, where they will mature and survive in the long term (analyzed time of 65 days after ischemia) as predicted functional neurons.

On the other hand, the results obtained regarding the second objective demonstrate that TLR4 is necessary for a better resolution of the infarcted area in the chronic phase of a cerebral ischemia. Also, regarding the role of this receptor in

neurogenesis, the study of its effect in non-ischemic conditions reiterated that TLR4 has an inhibitory role in the number of proliferating cells in the SVZ which translates consequently into fewer of neuroblasts migrating through the migratory rostral stream (eutopic migration). Similarly, the study of neural populations demonstrated the absence of changes in basal conditions in total neural stem cells (NSCs) and neural progenitor cells (NPCs), as well as in the proliferative state of them, without showing any changes either in the percentage of activated type B cells or type C cells. In relation to the role of TLR4 in the acute phase of ischemia, we have shown that the previously observed decrease is partially TLR4-dependent, with a greater number of proliferating cells in TLR4+/+ animals. These results were corroborated by *in vitro* experiments with the use of DAMPs whose release after ischemia has been described. In the analysis of the neural populations, there is no difference in the total of NSCs and NPCs or in the quiescent cell percentage in the acute phase of ischemia. However, a decrease in the proliferative NSCs percentage was demonstrated, according to the previous result. In addition, in relation to the main neural populations TLR4 is involved in the maintenance of a greater number of activated type B cells in the SVZ as well as in the induction of a decrease in type C cells compared to baseline in the acute phase of ischemia. The analysis of eutopic migration emphasised the increase in the acute phase previously observed in wildtype animals, whereas in TLR4-deficient animals this migration is not modified, which seems to indicate that TLR4 is necessary to facilitate a transient increase in neuroblast eutopic migration in the acute phase of ischemia. In the study of the chronic phase of ischemia, TLR4 again plays a deleterious role in proliferation, just as it was observed in a physiological situation. Bilateral proliferation in the SVZ described for wildtype animals is still observed in animals deficient in TLR4, which reinforces the hypothesis that changes in this parameter are due to modifications in the composition of CSF since this liquid is in direct contact with both ventricles.

The remaining analyses focused on the study of the mechanisms involved in the delay in ectopic neuroblast migration in animals deficient in TLR4, an event described in the literature (Moraga et al., 2014). Our results demonstrated that TLR4 deficiency is implicated in a delayed resolution of inflammation in the damaged area. This study showed temporal changes in the expression of pro-inflammatory molecules such as IL-6, MCP-1 or IL-1 β in the peri-infarct cortex. Also, the molecules involved in the potentiation of neuroblast migration, such as SDF-1 α and BDNF, are delayed in their

expression over time as a consequence of the receptor deficiency. We have also demonstrated the involvement of astrocytes in this process, both by increasing the expression of neurogenic mediators due to the specific activation of TLR4 and by analysing their role in the rate of neuroblast migration using *in vitro* migration systems. Likewise, we have observed that the activation of TLR4, both by treatment with PAMPs (LPS) and DAMPs (HMGB1) on NSCs itself induces a differentiation to neuroblast and an activation of its migratory potential.

In summary, the results obtained in this doctoral thesis have demonstrated that after an experimental ischemia the different phases of neurogenesis will be modified over time. Therefore, it is important to know at what time of the disease it would be more beneficial to enhance each phase. That fact would be of great importance in order to obtain a greater number of new functional neurons in the infarcted cortex that could lead to a better patient recovery reducing as much as possible the neurological deficits associated with this disease. In addition, this study emphasises the importance of TLR4 as a therapeutic target to enhance neurogenesis after ischemic stroke promoting the proliferation process and as a positive modulator of ectopic neuroblasts migration.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Enfermedad cerebrovascular

La **enfermedad cerebrovascular** (ECV), como concepto, se refiere a todo trastorno patológico en el cual un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados. Dependiendo de la duración del trastorno, las ECV se clasifican en ataque isquémico transitorio (AIT), con una duración menor de 24 horas, presentando un carácter reversible y no produciendo déficits neurológicos, o en ictus, cuando el proceso se prolonga durante más de 24 horas, produciendo secuelas neurológicas (Diez-Tejedor et al., 2001).

Según lo anterior, el **ictus** es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "el desarrollo rápido de síntomas clínicos indicativos de un trastorno local o generalizado de la función cerebral, con síntomas que persisten 24 o más horas o que conducen a la muerte sin que exista causa aparente otra que la vascular" (WHO, 1988). Desde el punto de vista etimológico, la palabra ictus proviene del latín y significa golpe.

El ictus es la primera causa de mortalidad entre las mujeres españolas y la segunda en los varones, según datos del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (GEECV-SEN). También constituye la primera causa de discapacidad en mayores de 65 años (Sousa et al., 2009). Además, recientes evidencias sugieren que entre el 25-30% de supervivientes a un ictus desarrollan, bien inmediatamente o bien de manera tardía, un importante deterioro cognitivo o demencia vascular (Kalaria et al., 2016).

Como consecuencia de una obstrucción parcial o total del flujo sanguíneo, se altera de forma transitoria o definitiva el funcionamiento de parte cerebro, ya que se reduce la llegada de nutrientes y oxígeno a las células presentes en el área afectada. Esto provoca una pérdida masiva de neuronas así como de otras células que lleva como resultado a déficits neurológicos produciendo discapacidad, en mayor o menor grado, en la persona afectada por la enfermedad. Los síntomas que se manifiestan dependen del área irrigada por el vaso cerebral afectado, pudiendo revertirse si se produce una recanalización temprana del mismo. Aun así, una gran parte de los pacientes que sobreviven a un infarto cerebral suelen desarrollar una serie de secuelas que limitan

tanto la vida del paciente como la de su familia. Tras 6 meses del inicio de la enfermedad aproximadamente un 20% de los pacientes presentan afasia, un 50% hemiparesia, y un 30% algún grado de dependencia (Kelly-Hayes et al., 2003).

Debido a lo anteriormente citado, el ictus supone un gran **gasto socioeconómico**, siendo responsable del 3 al 6% del gasto total sanitario en España, por lo que obtener avances en prevención y tratamiento de la enfermedad es de gran importancia.

El ictus es una enfermedad compleja y suele tener su causa en la presencia de una combinación de **factores de riesgo**, siendo definidos éstos, según la OMS, como cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente la probabilidad de sufrir la enfermedad. Existen diversos estudios epidemiológicos que tratan de identificar dichos factores y de estudiar su evolución en la sociedad, siendo uno de ellos el estudio INTERSTROKE (O'Donnell et al., 2010). Los factores de riesgo se pueden clasificar, de forma general, en factores de riesgo no modificables o incontrolables, o factores de riesgo potencialmente modificables o controlables (Sacco et al., 1997) (Tabla 1).

Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables
Edad (la incidencia del ictus aumenta con la edad)	Hipertensión arterial Fibrilación auricular Ataque isquémico transitorio previo
Sexo (menores de 75 años, mayor incidencia en varones; mayores de 75 años, mayor incidencia en mujeres)	Tabaco, Alcohol, Dieta, inactividad física Obesidad, Hipercolesterolemia
Grupo étnico (mayor riesgo de ECV en afroamericanos y nativos americanos que en individuos de raza blanca)	Factores psicosociales (el estrés y la depresión incrementan el riesgo de sufrir un ictus)
Factores genéticos (existe una predisposición familiar a sufrir un ictus)	Diabetes Mellitus (alteraciones en el metabolismo de la glucosa incrementa riesgo de ECV)

Tabla 1. Clasificación de los factores de riesgo que incrementan el riesgo de sufrir un ictus. Los factores de riesgo no modificables no pueden ser controlados ni alterados, mientras que los factores de riesgo modificables pueden ser controlados con un tratamiento médico adecuado y son en parte dependientes del estilo de vida del paciente.

1.1.1.- Clasificación

Se han establecido diversas clasificaciones de las ECV entre las que destacan cronológicamente las realizadas por el *Oxfordshire Community Stroke Project* (OCSP) (1983), el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) (1990), la clasificación del ensayo multicéntrico TOAST (*Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*) (1993) (Adams et al., 1993) y la clasificación A.S.C.O (*Atherosclerosis-small vessel disease-cardiac source-other*) (Amarencu et al., 2009), entre otras. En general, las distintas clasificaciones de las ECV se crearon atendiendo, entre otros parámetros, a su naturaleza, el territorio afectado, su duración o la etiología de la lesión.

Según su naturaleza, las enfermedades cardiovasculares pueden clasificarse en isquémicas o hemorrágicas. El **ictus isquémico**, también denominado isquemia focal, y correspondiente a alrededor de un 85% de los casos, se produce por la disminución del aporte sanguíneo a una región del cerebro. El **ictus hemorrágico**, que abarca aproximadamente un 15% de los casos, se debe a la presencia de sangre en el interior del cerebro (parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales) o en el espacio subaracnoideo. El ictus isquémico focal, a su vez, se puede clasificar dependiendo de su etiología en aterotrombótico (10-35%), cardioembólico (25-35%), lacunar (20-30%), de causa inhabitual (2-5%) o de causa indeterminada (15-35%) (**Figura 1.1**).

- El ictus de etiología **aterotrombótica**, también denominado ictus de gran vaso, se produce por la formación de placas de ateroma en, generalmente, bifurcaciones entre dos vasos de gran calibre. Debido a las placas de ateroma se produce una estenosis progresiva o el desprendimiento de las mismas produciéndose una disminución del riego sanguíneo en territorios distales.
- El ictus de etiología **cardioembólica**, por otro lado, se produce cuando un émbolo de origen cardiaco se transporta hasta una arteria de calibre demasiado pequeño para permitir su paso, de manera que ésta se ocluye.
- El infarto **lacunar** tiene lugar por la oclusión de las arterias lenticuloestriatales, también denominado infarto de pequeño vaso.
- Se denominan infartos **de causa inhabitual** cuando la causa que lo produce es conocida pero no se engloba en ninguna de las anteriores.
- El último subtipo de ictus isquémico focal es el de **etiología indeterminada**, en el cual no se conoce la causa o tiene causas múltiples.

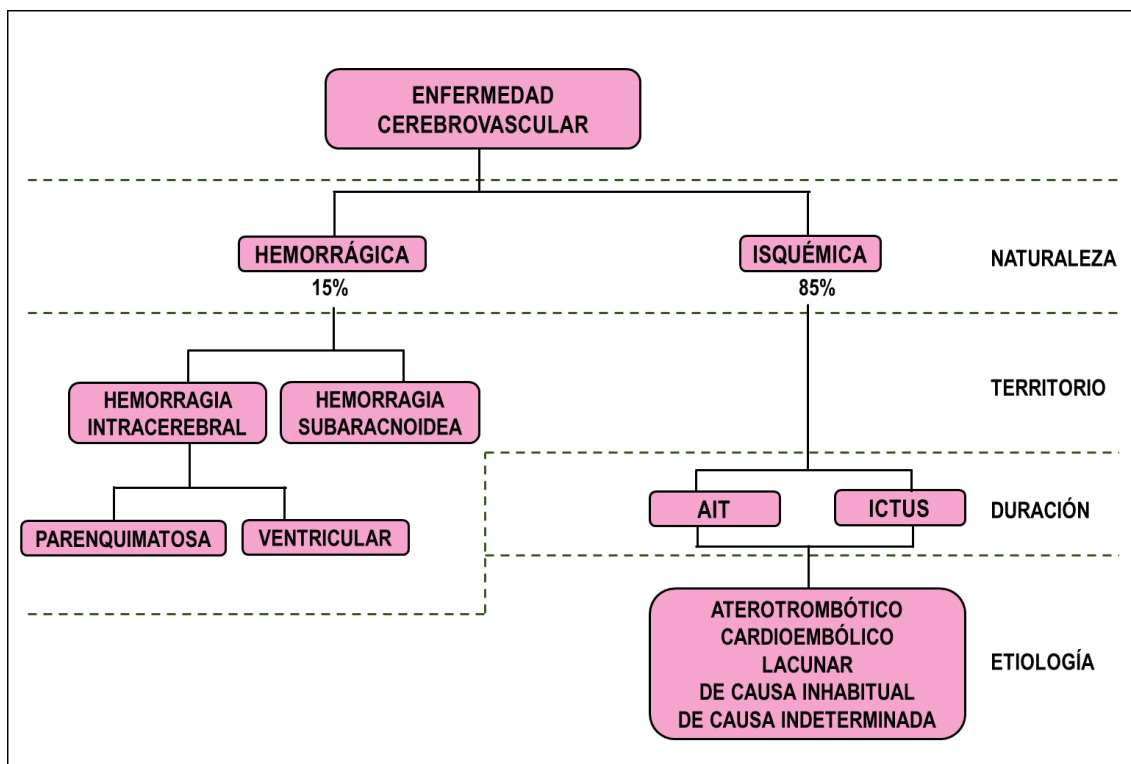


Figura 1.1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (Modificado de Díez-Tejedor et al, 2001).

1.1.2.- Ictus isquémico

Cuando la interrupción del flujo se produce de forma permanente (ictus isquémico) los síntomas en el paciente persisten debido al desencadenamiento de una serie de eventos bioquímicos conocidos como **cascada isquémica**, que va a afectar a todas las células que conforman la denominada unidad neurovascular.

La **unidad neurovascular** está constituida por la neurona, astrocitos, pericitos, microglía y el endotelio formando una estructura con una estrecha y regulada relación que permanece intacta en un parénquima sano y que se verá afectada en condiciones de isquemia (Sandoval and Witt, 2008).

En la lesión isquémica, el tejido va a sufrir diferentes grados de reducción del flujo sanguíneo dependiendo de la irrigación producida por los vasos colaterales. Sin embargo, se pueden identificar dos áreas específicas de daño bien definidas: el **core** o núcleo isquémico y la zona de penumbra (Astrup et al., 1977; Astrup et al., 1981; Pulsinelli, 1992). El **core** es el área más afectada por la reducción del flujo sanguíneo cerebral, existiendo en el mismo un flujo aproximado al 10% del basal. Las células

presentes en dicho área mueren rápidamente por necrosis (aproximadamente a los 10 min de la interrupción del flujo sanguíneo) como consecuencia de un fallo bioenergético producido por el estrés metabólico que se induce. Entre el núcleo isquémico y el parénquima cerebral normalmente perfundido existe el área de **penumbra**, con una perfusión remanente de entre el 10-30% del flujo basal, siendo este área el objetivo de los tratamientos neuroprotectores. Si se consigue restaurar el flujo sanguíneo del vaso afectado, este área será susceptible de recuperación pero, si no es así, las células presentes en la zona de penumbra entrarán en apoptosis y morirán (Fisher and Albers, 2013). A pesar de la distinción teórica tan clara realizada entre ambas zonas, en realidad el límite entre el *core* y la penumbra es más difuso y difícil de estudiar. Esto es debido a que la isquemia no va a afectar por igual a todos los tipos celulares que componen la unidad neurovascular, sino que habrá células más o menos susceptibles que entrarán en apoptosis antes o después de la reducción de flujo sanguíneo.

1.1.3.- Cascada isquémica

Como consecuencia de la reducción del flujo sanguíneo cerebral, la llegada de oxígeno y glucosa a las células del área afectada se ve comprometida. Debido a la reducción de la disponibilidad de oxígeno, el metabolismo de la glucosa es desviado a la vía anaerobia, produciendo un aumento de ácido láctico, y la consiguiente acidosis, tanto de la zona afectada como de la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Hakim and Shoubridge, 1989; Mutch and Hansen, 1984).

La **acidosis** va a llevar a la inhibición de la fosforilación oxidativa necesaria para la producción de ATP (Hillered et al., 1985), produciendo un déficit energético, favoreciendo la edematización celular y aumentando la concentración de calcio libre intracelular (Folbergrova et al., 1990). Todo ello contribuye a la lesión endotelial y la liberación hierro iónico de su unión a proteínas en depósitos intracelulares lo que facilita la formación de radicales libres (Davalos et al., 2000; Hurn et al., 1995; Lipscomb et al., 1998).

El **fallo bioenergético** que se produce da lugar a un fallo en el funcionamiento en las bombas sodio-potasio y otras bombas iónicas dependientes de ATP, lo que conlleva a una disminución del K^+ intracelular y, por tanto, a la despolarización de la membrana.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje actúan como sensores de la despolarización anteriormente citada, produciendo su apertura y ocasionando, como consecuencia, un **incremento del Ca^{2+} intracelular** (Pulsinelli, 1992).

A su vez, la despolarización de la membrana induce también la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Choi and Rothman, 1990), que estimula receptores de membrana ionotrópicos (AMPA y NMDA) y receptores metabotrópicos. La estimulación de los receptores NMDA lleva a un incremento del Ca^{2+} intracelular (Choi et al., 1988), aumentando la activación de diversas enzimas líticas (lipasas, endonucleasas y proteasas), y la activación de las óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas, que desembocarán en un **daño celular irreversible**.

Además, se induce un **estrés oxidativo** debido a que la producción de radicales libres supera a los mecanismos endógenos anti-oxidantes. Tras la isquemia, se incrementan las especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs) (Kontos, 1985; Love, 1999; Siesjo et al., 1989), que actúan como importantes mediadores del daño celular. Dentro de las principales EROs producidas tras la isquemia cerebral destacan el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generado a través de la xantina oxidasa y el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido a partir del superóxido y, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que se genera a partir del peróxido de hidrógeno (Fridovich, 1978). Respecto a las ERNs, las principales especies reactivas de nitrógeno son, el óxido nítrico (NO), el cual se produce a través de la acción de tres tipos de óxido nítrico sintasas (NOS) diferentes, y el peroxinitrito (ONOO^-) (Beckman and Koppenol, 1996). La producción de EROs y ERNs va a tener un importante papel deletéreo sobre la inactivación enzimática, la alteración de la función mitocondrial, la disfunción de la barrera hematoencefálica, la desnaturalización proteica, la peroxidación lipídica, alteraciones en la homeostasis iónica y cambios en la expresión génica y la señalización celular. Todos estos eventos producen en la zona afectada un mecanismo celular autodestructivo que puede ser por necrosis, en el caso de un estrés oxidativo grave, o por apoptosis, en el caso de un proceso de oxidación moderado (Evans and Cooke, 2004; Liu et al., 1996).

Otro de los eventos de la cascada isquémica es **la rotura de la barrera hematoencefálica** (BHE), estructura necesaria para la regulación de la homeostasis cerebral y para el mantenimiento del privilegio inmunológico. A nivel estructural, la BHE

está formada por células endoteliales conectadas a través de las denominadas “uniones estrechas”, dotándola de una baja permeabilidad o una permeabilidad selectiva para el paso de sustancias al cerebro. El daño isquémico produce, como se ha explicado anteriormente, la acumulación de EROs y ERNs, así como la activación de metaloproteasas de matriz (MMPs). Éstas promueven de manera activa la rotura de la barrera y el incremento de su permeabilidad, induciendo la pérdida de la permeabilidad selectiva e incrementando la extravasación de proteínas sanguíneas de alto peso molecular que se acumulan en el compartimento extracelular y se extienden por el tejido isquémico y por el tejido periférico sano (**Figura 1.2**).

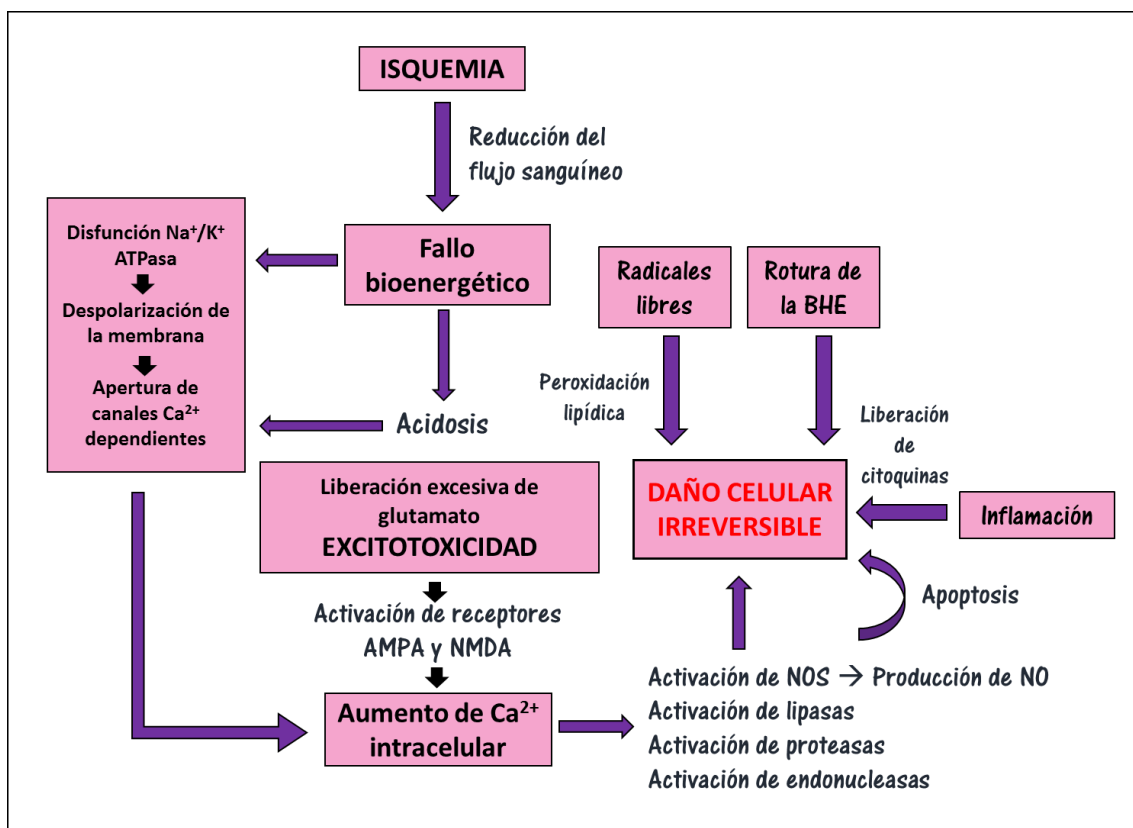


Figura 1.2. Representación esquemática de la cascada isquémica. Principales eventos celulares y moleculares desencadenados tras una isquemia que llevan como punto final a un daño celular irreversible.

La progresión de la cascada isquémica y el daño irreversible que se produce como consecuencia lleva a la liberación de “señales de peligro” por parte de células muertas o en proceso de morir. Estas señales, que se describirán más adelante, activan el sistema inmune a través de distintas familias de receptores induciendo la liberación y/o expresión de moléculas quimioatrayentes y de adhesión y a la subsiguiente

infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral. Así, la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), son dos citoquinas que inician la respuesta inflamatoria y que inducen una segunda respuesta inflamatoria, mucho más persistente, mediada por otras dos citoquinas, la IL-6 y la IL-8. Estas dos últimas desempeñan un importante papel en el desarrollo de reactantes de fase aguda, incluyendo la fiebre, la proteína C reactiva y el fibrinógeno, y en la liberación de un grupo de moléculas, conocidas como adhesinas, (L-selectina, E-selectina y P-selectina) y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), las moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), las moléculas de adhesión plaquetoendotelial-1, y las integrinas. Todas ellas intervienen en procesos que conducen a la infiltración de leucocitos circulantes en el parénquima dañado que, a su vez, liberan más **mediadores inflamatorios** potenciando el daño tisular.

1.1.4.- Tratamientos y estrategias terapéuticas. Neuroreparación

Según la Sociedad Española de Neurología (SEN), se ha observado en los últimos años en España un aumento del 40 por ciento en el número de personas atendidas por ictus en los hospitales del Sistema Nacional de Salud (SNS). Sin embargo, en los últimos 20 años se ha registrado una tendencia a la baja en la mortalidad gracias a los esfuerzos de prevención, detección precoz y mejora de la atención especializada hospitalaria. A pesar de estos datos esperanzadores, las enfermedades del sistema circulatorio siguieron siendo las causantes en 2014 de aproximadamente un 29,7% de las defunciones producidas y un 8% del total de las defunciones en hospitales fueron debidas a enfermedades cerebrovasculares, por lo que avanzar en su prevención, tratamiento y recuperación sigue siendo una necesidad de primer grado.

La disminución de la mortalidad observada en los últimos años se ha debido principalmente a la prevención mediante el control de los factores de riesgo y a la implantación de las **unidades de ictus**. Estas se definen como unidades especializadas en el manejo del ictus con protocolos unificados de tratamiento y con un riguroso control de las medidas generales en el paciente (temperatura, presión arterial, glucemia...) (Hanger et al., 2007; Terent et al., 2009).

En la actualidad, los tratamientos aprobados para el ictus se reducen a la eliminación mecánica del trombo por medio de una trombectomía, y a la disolución del mismo mediante trombolisis.

La **trombectomía** es un **tratamiento no farmacológico** que consiste en una reperfusión mecánica del vaso ocluido mediante una intervención quirúrgica utilizando un dispositivo mecánico. Los diferentes dispositivos que se utilizan en la trombectomía se pueden dividir en dispositivos de acción proximal, que actúan en la parte proximal del trombo, y dispositivos distales, que ejercen su fuerza en la base distal del trombo.

La FDA aprobó en el 2004 el dispositivo *Merci (Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia) Retriever*, un dispositivo en espiral para la disrupción y extracción del trombo, para la trombolisis mecánica en pacientes con ictus isquémico no candidatos a trombolisis sistémica o bien, como terapia de rescate en los pacientes no respondedores al tratamiento trombolítico (Gobin et al., 2004).

Posteriormente, se han desarrollado nuevos dispositivos para la trombectomía mecánica, entre ellos el sistema Penumbra, cuyo mecanismo de acción se basa en la aspiración además de la extracción del trombo (Bose et al., 2008). En 2015, se publicaron un conjunto de artículos que recogían los resultados obtenidos en distintos ensayos clínicos realizados los últimos años (Hacke, 2015; Jolly et al., 2015; Jovin et al., 2015; Saver et al., 2015; Urra et al., 2015). En ellos, se demostraba la mejora en la capacidad funcional de los pacientes de ictus sometidos a dicha cirugía.

En el año 1995, el NINDS (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*) publicó por primera vez un **tratamiento farmacológico trombolítico** beneficioso para pacientes de ictus isquémico en la fase aguda de la enfermedad (1995). Dicho tratamiento consistía en la recanalización de la arteria ocluida mediante la administración intravenosa del activador tisular del plasminógeno recombinante (**r-tPA**). Este tratamiento fue aprobado en 1996 por la FDA americana (*Food and Drug Administration*) y en 2002 por la agencia europea EMA (*European Medicines Agency*) y es hoy en día el único tratamiento farmacológico aceptado para el tratamiento de la fase aguda del ictus isquémico. Sin embargo, a pesar de mejorar el pronóstico funcional y disminuir los déficits, su uso se reduce a menos del 5% de los pacientes –en términos globales- debido a los elevados criterios de exclusión incluyendo la reducida ventana terapéutica (<4.5 h) para su administración y el elevado riesgo de producir

transformación hemorrágica (Larrue et al., 2001). A los anteriores criterios de exclusión se añaden los pacientes mayores de 80 años, diabéticos o con hiperglucemia, hipertensos, tratados con anticoagulantes, con lesiones extensas o con historia previa de ictus (McArthur et al., 2011).

Desde el punto de vista mecanístico, el r-tPA es una serín-proteasa con capacidad de transformar el zimógeno plasminógeno en plasmina. En el compartimento vascular, los trombos están formados por la agregación de plaquetas y la formación de una malla de fibrina generada a partir del fibrinógeno. La plasmina que se genera mediante acción del vía r-tPA produce la fibrinólisis del trombo induciendo la recanalización de la arteria ocluida (Lemarchant et al., 2012). Sin embargo, debido a las restricciones que presenta dicho tratamiento, se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos que puedan ser aplicados sin riesgos para los pacientes así como con una ventana terapéutica más amplia.

Además de la trombolisis, existen distintas estrategias farmacológicas potenciales para el tratamiento del ictus, basadas fundamentalmente en dos áreas: neuroprotección y neurorreparación.

El área de la **neuroprotección** está enfocada a reducir o impedir el daño ocasionado por la isquemia cerebral en su fase aguda o por la reperusión tardía del área de penumbra. Hasta la fecha, los aproximadamente 200 ensayos clínicos realizados con diferentes agentes presumiblemente neuroprotectores (<http://www.strokecenter.org/trials/>) que habían mostrado resultados positivos en modelos experimentales (O'Collins et al., 2006), no han mostrado beneficio a nivel clínico en fase aguda del ictus isquémico (Minnerup et al., 2012). El fracaso en la traslación a la clínica podría ser debido a diversas causas, recogidas en la convención STAIR (*Stroke Treatment Academic Industry Roundtable*, 1999), entre ellas a un diseño inapropiado de los ensayos clínicos o a insuficientes estudios a nivel pre-clínico (**Tabla 2**). Entre estas razones se encuentran el uso de animales jóvenes y sanos, las ventanas terapéuticas ensayadas o la heterogeneidad de los ictus en pacientes. Esto indica que los modelos experimentales de isquemia cerebral utilizados en la actualidad podrían no ser lo más adecuados, (Albers et al., 2011; Sutherland et al., 2012).

Aquellos pacientes que consiguen sobrevivir a un ictus en su fase aguda van a entrar en la fase crónica de la enfermedad. En esta fase van a experimentar una lenta

mejoría que se desarrollará a lo largo de las primeras semanas o incluso meses. Este periodo activo es conocido como **neurorreparación** y se produce de manera espontánea por el propio organismo. Este hecho ha alentado a los investigadores a centrarse en la búsqueda de terapias que permitan potenciar la neurorreparación, intentando reconstruir parcialmente el tejido dañado potenciando mecanismos celulares endógenos como la neurogénesis y la angiogénesis, entre otros (Duncan et al., 1992), teniendo como objetivo final la restauración de la función neurológica.

Ensayos pre-clínicos (MODELOS ANIMALES)	Ensayos clínicos (ESTUDIOS HUMANOS)
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Población homogénea ➤ Animales jóvenes ➤ Animales sanos ➤ Sin comorbilidades o comorbilidad limitada ➤ Infarto cerebral inducido y con un determinado territorio afectado ➤ Etiología uniforme ➤ Administración temprana del fármaco ➤ Control del tiempo de oclusión ➤ Etc. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Población heterogénea ➤ Pacientes en edad avanzada ➤ Numerosas comorbilidades ➤ Infarto cerebral espontáneo y territorio afectado variable ➤ Etiología variable ➤ Administración tardía del fármaco ➤ Tiempo de oclusión variable ➤ Etc.

Tabla 2. Principales causas del fallo en la traslacionalidad a la clínica de los potenciales agentes neuroprotectores ensayados para la fase aguda del ictus isquémico (Adaptado de Sutherland et al., 2012).

1.2.- Neurogénesis adulta. Etapas y regulación.

A finales del siglo XIX, Santiago Ramón y Cajal desarrolló la denominada “doctrina de la neurona” basada en la idea de que el sistema nervioso central estaba compuesto por células individuales. Esta idea venía englobada por diversos postulados, muchos de ellos demostrados con el tiempo y otros refutados. En 1928, Ramón y Cajal publicó “*Degeneration and regeneration of the nervous system*”, artículo en el que desarrolló la siguiente idea:

“Preciso es reconocer que, en los centros adultos, las vías nerviosas son algo fijo, acabado, inmutable. Todo puede morir, nada renacer” (Ramón y Cajal, 1928).

Este dogma, que presentaba la incapacidad de las neuronas para multiplicarse, se mantuvo hasta pasada la segunda mitad del siglo XX, tiempo en el cual Joseph

Altman describió la generación de nuevas neuronas en el cerebro de mamíferos adultos en dos zonas específicas: el bulbo olfatorio (BO) (Altman, 1969) y el giro dentado del hipocampo (Altman and Das, 1965). Si bien la definición se produjo en la década de los 60, no fue hasta finales del siglo XX cuando este hecho fue aceptado por la comunidad científica.

La **neurogénesis**, definida como el proceso de generación de nuevas neuronas funcionales a partir de precursores, está restringida en el cerebro adulto en condiciones basales prácticamente a las dos zonas o **nichos neurogénicos** definidos inicialmente por Altman, la **zona subventricular** (ZSV) del ventrículo lateral y la **zona subgranular** (ZSG) del hipocampo. Estos nichos están compuestos por diversos tipos celulares como células endoteliales y ependimales, astrocitos, microglía y neuronas maduras, todos ellos responsables de crear un microambiente en el cual puedan almacenarse células madre neurales adultas capaces de mantener su naturaleza indiferenciada y quiescente, pero también de proporcionar señales que induzcan la proliferación, migración e iniciar los primeros pasos de la diferenciación (Faigle and Song, 2013; Gage, 2000).

Existen diversos estudios que describen procesos de neurogénesis adulta en otras áreas del cerebro distintas a las anteriormente citadas; sin embargo, estos hechos son a día de hoy aún controvertidos (Gould, 2007).

El proceso de neurogénesis incluye múltiples y complejas fases que se engloban en tres grandes etapas: **proliferación**, **migración** y **diferenciación** e integración. Este proceso es regulado tanto espacial como temporalmente por señales del ambiente celular así como por factores que difunden a través del cerebro (Ohab and Carmichael, 2008).

Cada nicho neurogénico tiene una función designada en el cerebro adulto. En el caso de la ZSG, las células madre dan lugar a nuevas neuronas granulares que se van a integrar en el giro dentado contribuyendo a funciones cognitivas como la memoria o el aprendizaje (Kempermann et al., 2015). En el caso de la ZSV, área estudiada en la presente Tesis Doctoral, los precursores generados van a migrar a través de la **ruta migratoria rostral** (RMR) hacia el **bulbo olfatorio** (BO) donde se van a integrar diferenciados a interneuronas cumpliendo funciones olfativas (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002) (**Figura 1.3**).

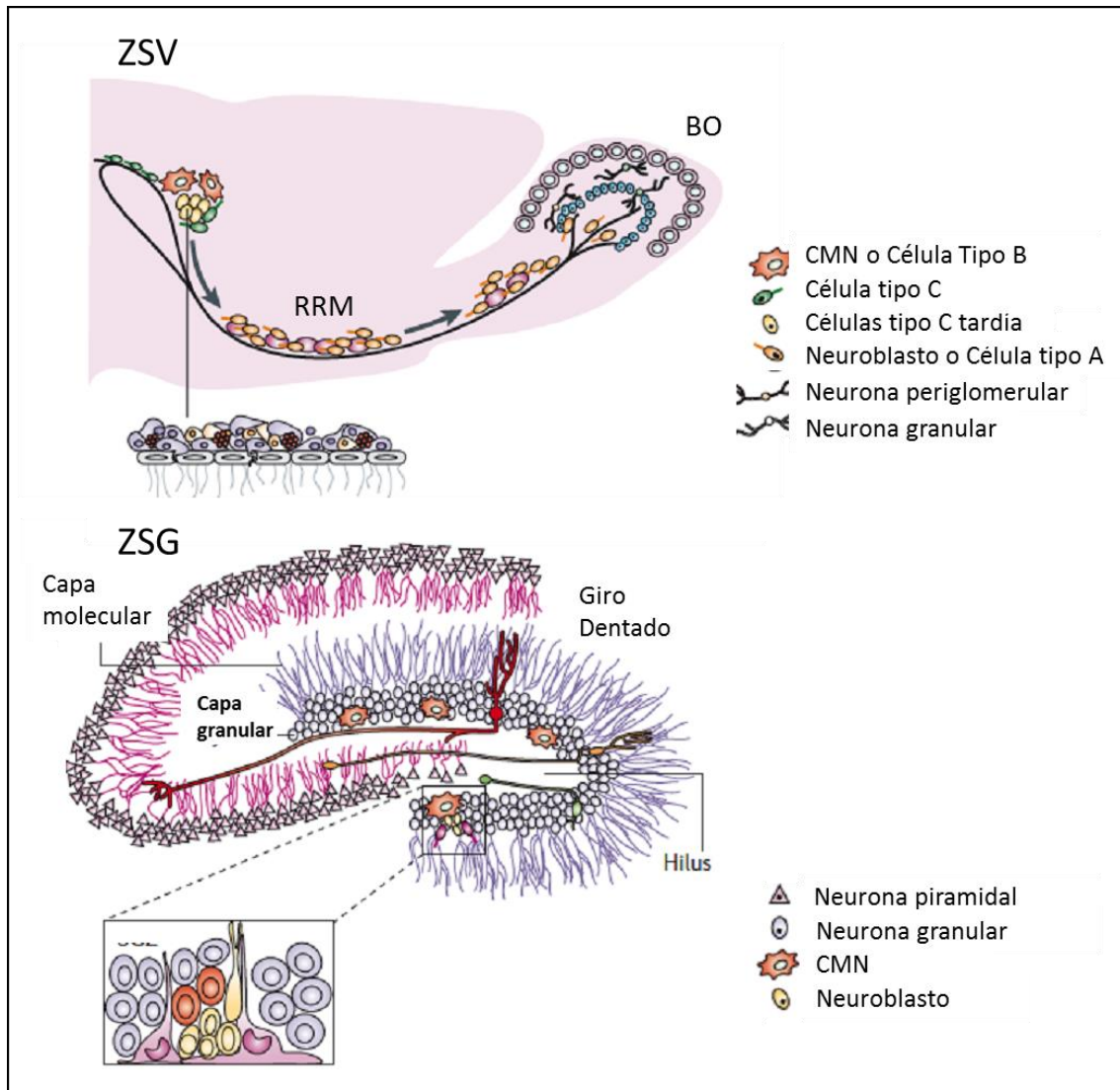


Figura 1.3. Representación gráfica de las zonas neurogénicas del cerebro adulto. En la ZSV los neuroblastos migran a lo largo de la ruta migratoria rostral (RMR) hasta el bulbo olfatorio (BO) mientras que, en la ZSG del giro dentado del hipocampo, los progenitores migran hasta la capa granular adyacente (Modificado de (Vescovi et al., 2006)).

En base a la morfología, a la expresión de marcadores celulares, a la cinética de proliferación, así como al potencial de diferenciación, existen cuatro tipos celulares que conforman la ZSV: las *células de tipo A* (neuroblastos), de *tipo B* (el estadio más indiferenciado, denominadas células madre neurales (CMNs)), células *de tipo C* (o células de amplificación transitoria) y células *de tipo E* (células endodiales).

1.2.1.- Proliferación en la zona subventricular

En el sistema nervioso, las CMNs tienen la capacidad de autorrenovación teóricamente ilimitada, permitiendo la producción ilimitada de progenie, y multipotencial con capacidad de diferenciación a los distintos tipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage, 2000).

En la ZSV, las CMNs, denominadas células de tipo B, pueden encontrarse en dos estadios: células de **tipo B quiescentes** y células de **tipo B activadas**, ambas encargadas de mantener la reserva de células indiferenciadas en el nicho. Las células de tipo B activadas, capaces de formar neuroesferas *in vitro* (Doetsch et al., 1999), proliferan lentamente *in vivo* y dan lugar a células de amplificación transitoria o células de **tipo C** mediante división asimétrica. Las células de tipo C forman agrupaciones en el nicho generando rápidamente una elevada cantidad de progenitores neurales. Estas células pasan por un primer estadio con capacidad proliferativa denominado pre-neuroblasto o células de **tipo C tardías** (Obernier et al., 2011; Wang et al., 2011), pasando posteriormente a un estado más diferenciado, perdiendo la capacidad de proliferar e incrementando el potencial migratorio aumentando la expresión de doblecortina (DCX) (neuroblastos o **células de tipo A**) (Figura 1.4).

En la ZSV, la composición del LCR puede influenciar las distintas fases de la neurogénesis. Las paredes ventriculares están cubiertas por células endoteliales ciliadas (células de tipo E), que permiten el movimiento y regulan el flujo del LCR mediante movimientos sincronizados del cilio (Banizs et al., 2005).

Desde el punto de vista de los **marcadores celulares**, las células de tipo B, C y E expresan **prominina-1** (Walker et al., 2013). Este marcador se pierde al finalizar la diferenciación a neuroblastos (tipo A). Respecto a los tipos celulares más indiferenciados, las células de tipo B y C expresan **nestina**. A su vez, y como manera de discernir entre ambos tipos celulares, las células de tipo B expresan el marcador astrocitario **GFAP** mientras que las células de tipo C expresan **Mash-1**. En el paso de célula de tipo C a tipo C tardía se pierde la expresión de nestina, pero no así de Mash-1 (Ponti et al., 2013). Todas las células que se mantienen activamente proliferativas expresarán en su membrana el receptor **EGFR**, lo que permitirá diferenciar entre células de tipo B quiescentes y activadas así como entre neuroblastos proliferativos y migratorios (Codega et al., 2014; Ming and Song, 2011; Pastrana et al., 2009).

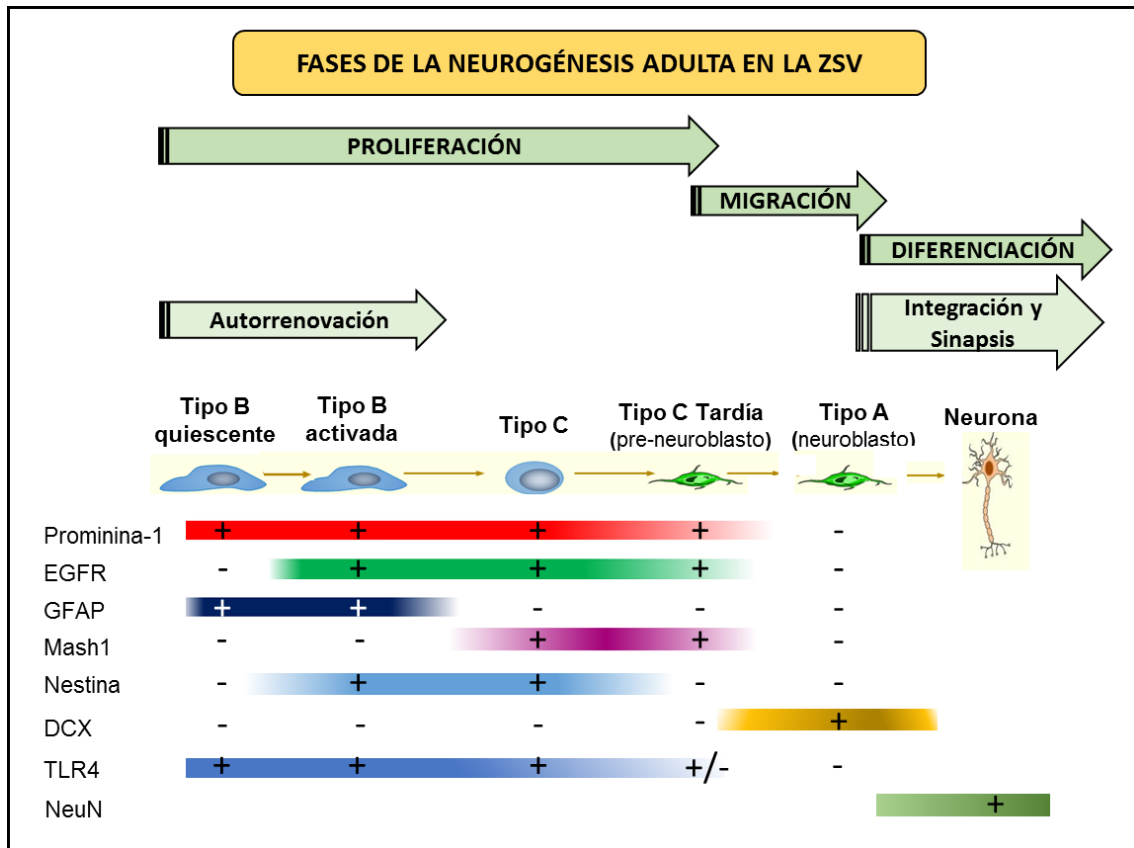


Figura 1.4. Esquema de las etapas de la neurogénesis adulta en la ZSV, los principales tipos celulares neurales y los marcadores utilizados para su caracterización.

1.2.2.- Migración de neuroblastos a través de la ruta migratoria rostral

Las células de tipo A generadas en la ZSV migran hacia el BO a través de la RMR a una velocidad de 70-80 $\mu\text{m/h}$ (Nam et al., 2007). En dicha ruta, los neuroblastos forman cadenas y migran tangencialmente a través de soportes de migración como el tubo glial o vasos sanguíneos. La migración va a depender de un complejo balance entre la producción de moléculas quimioatrayentes, quimiorrepelentes y factores motogénicos, producidos tanto por las células del bulbo olfatorio como por las que conforman los soportes de migración (astrocitos, células endoteliales...), así como por los propios neuroblastos. Dichos factores van a influenciar tanto la velocidad de migración como la dirección de la misma (Gengatharan et al., 2016).

Algunos de los factores que modulan la migración de los neuroblastos son moléculas de adhesión celular, entre las que se encuentran la molécula de adhesión celular neural polisializada (PSA-NCAM), proteínas de matriz extracelular, factores secretados y de membrana con capacidad quimioatrayente o quimiorrepulsora como

netrinas, neuroregulina-1, semaforinas..., así como distintos factores de crecimiento o neurotróficos como GDNF, HGF, IGF-1, VEGF o BDNF (Lalli, 2014).

1.2.3.- Diferenciación neuronal en el bulbo olfatorio

Una vez alcanzan el BO, los precursores neurales se desenganchan de la ruta y migran radialmente hacia el glómulo, lugar en el cual se diferencian a interneuronas granulares o periglomerulares que se integran en el circuito neuronal (Ming and Song, 2011). En un roedor joven, cada día se generan entre 10.000 y 30.000 neuroblastos de los cuales se integran en los circuitos funcionales aproximadamente la mitad. Estas nuevas neuronas participan en el circuito sináptico neuronal y están implicadas en la formación de memoria olfativa, discriminación de olores e interacciones sociales (Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

1.3.- Neurogénesis e ictus

1.3.1.- Regulación de la neurogénesis tras ictus

Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan la idea de que, tras un ictus, el cerebro activa un proceso de reparación y repoblación del área dañada mediante una estimulación de la neurogénesis endógena (Lindvall and Kokaia, 2015).

En 1998 se descubrió por primera vez la potenciación de la neurogénesis tras una isquemia global (Liu et al., 1998). Tras este trabajo inicial, fueron muchos los estudios que confirmaron este hecho tanto implicando la ZSV (Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001) como la ZSG (Arvidsson et al., 2001) de roedores, así como en el cerebro humano (Eriksson et al., 1998). Sin embargo, a pesar de todas las evidencias, los mecanismos que regulan este incremento de neurogénesis son todavía bastante desconocidos.

El ictus lleva a una serie de cambios dinámicos en el área isquémica que se suceden a lo largo del tiempo. Como se ha explicado previamente, en la fase aguda del ictus, las células del área dañada mueren induciendo un ambiente caracterizado por neurotransmisores excitotóxicos, radicales libres y mediadores proinflamatorios. Esta respuesta inflamatoria lleva a la activación microglial y apoptosis celular, ambiente hostil que puede limitar el proceso de neurogénesis endógena y la supervivencia de las

nuevas neuronas. Al mismo tiempo, las citoquinas y los factores neurotróficos liberados podrían promover la supervivencia celular.

1.3.1.1.- Proliferación tras isquemia

La isquemia cerebral incrementa la proliferación de los progenitores neurales tanto de la ZSV (Zhang et al., 2004) como de la ZSG (Arvidsson et al., 2001). Este incremento, producido por un acortamiento del ciclo celular, es transitorio comenzando a los 2 días (24% de células proliferando respecto al 15-21% en situación basal), alcanzando el máximo en una a dos semanas tras el inicio del daño (31% de células proliferando) (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2006) y recobrando sus niveles basales sobre las seis semanas tras el mismo (Thored et al., 2006).

Además de las modificaciones producidas en el ciclo celular, Zhang y colaboradores revelaron que el ictus producía de manera transitoria un cambio en la división de las CMNs de forma asimétrica a simétrica, incrementando así la reserva de CMNs en la ZSV (Zhang et al., 2004).

Aunque no están bien establecidos los factores que producen este cambio en la proliferación, algunos estudios implican moléculas como los miARNs (Liu et al., 2011; Liu et al., 2013), la vía de señalización de Notch (Androutsellis-Theotokis et al., 2006) o el receptor de factor de necrosis tumoral I (TNFR-1) (Iosif et al., 2008), entre otros.

1.3.1.2.- Migración ectópica de neuroblastos

A pesar de no ser el único nicho neurogénico, la ZSV ha sido identificada como la principal fuente de neuroblastos generados tras un ictus. Tras una isquemia cerebral, los neuroblastos son redirigidos desde la RMR predefinida hacia el área lesionada (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001) (**Figura 1.5**).

Independientemente de la zona dañada, estriado o corteza, los neuroblastos se redirigirán hacia ella. Ambas rutas de migración ectópica difieren en el camino seguido, los neuroblastos que migran hacia el estriado lo hacen directamente desde la ZSV, adyacente al estriado, mientras que los neuroblastos que viajan hacia la corteza isquémica lo hacen a través del cuerpo calloso (Ohab and Carmichael, 2008).

En ambos casos, la redirección implica una desregulación del equilibrio de citoquinas y otros factores que mantienen la migración hacia el BO, bien por una variación de la expresión de los mismos o por la implicación de nuevas células y nuevos factores. Esta migración ectópica comienza a los 3 ó 4 días desde el inicio del daño y se mantiene hasta aproximadamente 4 meses del mismo (Thored et al., 2006) y se observa de manera similar a la migración a través de la RMR, cadenas de neuroblastos con cuerpos celulares alargados asociados a astrocitos y vasos sanguíneos (Yamashita et al., 2006).

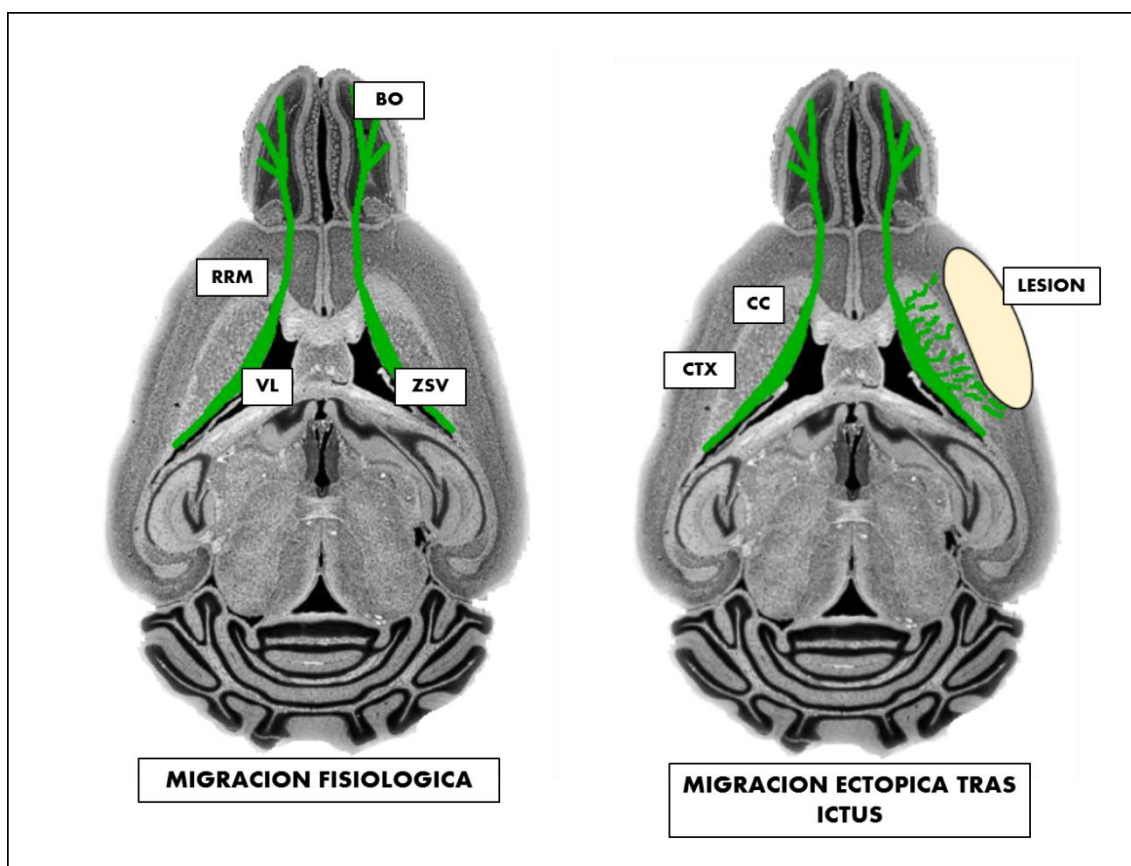


Figura 1.5. Esquema de la migración de neuroblastos generados en la ZSV en condiciones fisiológicas y tras una isquemia experimental cortical. Representación axial del cerebro de un ratón en el que se muestra cómo los neuroblastos se desvían de su ruta migratoria rostral hacia la lesión cortical (Saha et al., 2012). BO (Bulbo Olfatorio); CTX (Corteza); CC (Cuerpo Calloso); ZSV (Zona Subventricular); VL (Ventrículo Lateral); RMR (Ruta migratoria rostral).

El principal implicado en la redirección de los neuroblastos es el tejido cerebral dañado. Las CMNs de la ZSV pueden recibir el estímulo de daño por dos vías, a través de cambios en la composición del LCR, o a través de la difusión de señales desde la

zona de daño a la ZSV por el parénquima dañado o los vasos sanguíneos. Estas señales van a inducir cambios en su ruta migratoria normal (hacia el BO) siendo capaces de desviarse hacia el sitio del daño neuronal (Christie and Turnley, 2012; Lindvall and Kokaia, 2015).

- Uno de los factores implicados en la migración de neuroblastos tras un daño es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-derived neurotrophic factor*). Incrementos en este factor promueven la neurogénesis (Benraiss et al., 2001) e influyen en la migración de neuroblastos (Bagley and Belluscio, 2010).
- También ha sido implicado en la migración ectópica de neuroblastos el eje formado por el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1 α , del inglés *Stromal cell-derived factor-1*) y su receptor CXCR4. Tras un ictus, SDF-1 α se expresa en astrocitos reactivos y en microglía activada, ambos presentes en el área dañada, incrementando sus niveles en el hemisferio isquémico (Robin et al., 2006). El bloqueo de este eje da lugar a una migración atenuada de neuroblastos, lo que indica que regula de manera directa la migración de los mismos hacia la zona dañada (Thored et al., 2006).
- Otro factor de importancia en este proceso es la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1, del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*), sobreexpresada también en microglía activada y astrocitos reactivos. Las células de tipo A, expresan su receptor CCR2 tras isquemia cerebral. Al igual que en el caso del eje SDF-1 α /CXCR4, la deficiencia o bloqueo de MCP-1 o CCR2 lleva a un reclutamiento reducido de neuroblastos al área afectada (Yan et al., 2007).
- Para que los neuroblastos generados puedan avanzar a través del tejido, se va a liberar, parte por ellos mismos, parte por las células del tejido afectado, la metaloproteasa de matriz MMP-9. La administración de un inhibidor de la misma reduce de forma marcada la migración de neuroblastos, lo que indica que su función proteolítica de la matriz extracelular es necesaria para este proceso (Lee et al., 2006).

1.3.1.3.- Diferenciación neuronal en el área dañada

A pesar del descrito incremento en la proliferación y migración de neuroblastos tras la isquemia, muy pocos precursores consiguen alcanzar el área dañada y menos aún madurar y repoblar la zona; de hecho, únicamente un 0,2% de los precursores lo consigue (Arvidsson et al., 2002). Este hecho puede ser debido a distintos factores, como un ambiente inflamatorio hostil debido a la isquemia (Kahle and Bix, 2013) o un déficit de conexiones funcionales o del soporte trófico necesario (Ming and Song, 2011).

Por ello, aunque un incremento de la neurogénesis haya sido descrito, éste es insuficiente para reparar la zona dañada y compensar los déficits neurológicos en el paciente, aunque sí que es capaz de mejorar el pronóstico funcional del mismo (Lindvall and Kokaia, 2015).

1.3.2.- Neurogénesis e inflamación

La neuroinflamación como parte de la respuesta inmune innata en el SNC ha sido demostrada como un evento con un papel dual tras un ictus, desencadenante por un lado del daño cerebral en la fase aguda, pero también involucrada en procesos de neurorreparación durante la fase subaguda o crónica.

El efecto de la respuesta inmune producida tras la isquemia en la neurogénesis es un evento poco estudiado a día de hoy. Sin embargo, sí que se ha demostrado una importante interacción entre inflamación y neurogénesis (Jakubs et al., 2008; Tobin et al., 2014). En este contexto han sido propuestas tanto hipótesis que avalan el efecto beneficioso de la inflamación sobre la neurogénesis (Ziv et al., 2006), como otras que indican un efecto perjudicial (Iosif et al., 2006; Iosif et al., 2008).

Tras un ictus, el proceso inflamatorio lleva a una producción masiva de citoquinas por parte de la microglía activada y los astrocitos reactivos, así como a la infiltración masiva de células inmunes en el parénquima cerebral. Estas citoquinas pro- y anti-inflamatorias pueden influenciar la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de los progenitores neurales (Tobin et al., 2014).

Algunos de los estudios realizados en este aspecto se recogen a continuación:

- Meng y colaboradores demostraron que la IL-6 promueve la proliferación y la diferenciación de NPCs en la ZSV adulta, induciendo una mejora funcional tras

un ictus (Meng et al., 2015). Esta misma citoquina, sin embargo, ha sido descrita como inhibidora de la neurogénesis hipocampal en otro estudio (Vallieres et al., 2002).

- El análisis del papel de IL-1 en neurogénesis tras una isquemia cerebral ha dado lugar a varios trabajos. Por un lado, en la ZSV, niveles elevados de IL-1 β inhiben la proliferación y previenen la progresión del linaje, y mantienen un estado indiferenciado de las CMNs (Garcia-Ovejero et al., 2013; Kokovay et al., 2012; Wu et al., 2013). Por otro lado, el bloqueo del receptor de IL-1 tras un ictus isquémico, demostró una mejora funcional de los ratones así como un incremento de la proliferación de CMNs. A su vez, potenciaba la migración de neuroblastos e incrementaba el número de nuevas neuronas formadas en la corteza peri-infarto (Pradillo et al., 2016).
- Por último, otra de las moléculas implicadas en inflamación cuya acción sobre la neurogénesis ha sido descrita es TNF- α . Su sobreexpresión ha sido asociada a una disminución de la proliferación de CMNs y CPNs en la ZSV, mientras que su bloqueo demostró incrementar dicha proliferación así como la formación de progenitores neurales (Iosif et al., 2008).

1.4.- Implicación de TLR4 en neurogénesis tras ictus

1.4.1.- El sistema inmune innato y los receptores de reconocimiento de patrones

El sistema inmune tiene como función esencial proteger al huésped contra agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Este sistema presenta dos tipos de defensa: la innata y la adaptativa. El sistema inmune innato consiste en una primera línea de defensa tras la exposición a un agente patógeno y está formado por importantes tipos celulares entre los que se encuentran monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células *natural killer* (NK), así como importantes componentes como el sistema del complemento y una gran variedad de citoquinas y moléculas solubles (Hoffmann et al., 1999).

Las células que componen el sistema inmune innato tienen la capacidad de responder frente a señales de peligro y daño por medio de los denominados **receptores de reconocimiento de patrones** (PRRs) (Gallucci and Matzinger, 2001). Los PRRs son

capaces de reconocer, por un lado, patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o **PAMPs**), encontrados en un amplio rango de patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos y, por otro lado, señales endógenas asociadas a un daño tisular (*damage-associated molecular patterns* o **DAMPs**), liberadas por las células tras un daño. Una de las principales familias de PRRs descubiertas hasta la fecha son los receptores de tipo *Toll* o *Toll-like receptors* (TLRs).

1.4.2.- Receptores Toll-like (*Toll-like Receptors*, TLRs)

Los TLRs se identificaron originalmente en *Drosophila melanogaster* como proteínas de gran relevancia implicadas en vías importantes del desarrollo embrionario (Medzhitov et al., 1997).

Su síntesis se lleva a cabo en el retículo endoplasmático (ER), son transportados hasta el aparato de Golgi y, posteriormente, reclutados en endosomas a la superficie celular o a compartimentos intracelulares. El tráfico de TLRs desde el ER a los endosomas es regulado por la proteína UNC9B1 (Kim et al., 2008).

A nivel estructural, los TLRs son glucoproteínas transmembrana de tipo 1 que se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular (DEC), una hélice transmembrana simple, y un dominio intracelular TIR (Toll IL-1 receptor) de estructura similar al de los receptores de IL-1 (Bowie and O'Neill, 2000). El DEC es el dominio implicado en el reconocimiento de PAMPs y DAMPs y está compuesto de múltiples bloques de repeticiones ricas en leucina (LRR) plegados en una conformación de herradura.

Hasta la fecha se han descrito 10 miembros funcionales de la familia de TLRs en humanos y 12 en ratón, estando los TLR1-TLR9 conservados en ambas especies y cada uno con su función específica en términos de reconocimiento de PAMPs, DAMPs y respuesta inmune inducida. Según su localización, los TLRs se pueden clasificar en extracelulares (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11), presentes en la membrana plasmática, o intracelulares (TLR3, 7, 8 y 9), situados a nivel de retículo endoplasmático o en compartimentos endosomales-lisosomales (Manavalan et al., 2011). Los TLRs extracelulares van a reconocer, como PAMPs, componentes de la membrana microbial como lípidos, lipoproteínas y proteínas, mientras que los TLRs intracelulares reconocen

ácidos nucleicos microbianos (Kawai and Akira, 2010). Los principales ligandos que activan a cada tipo de receptor están recogidos en la **Tabla 3**.

	Ligandos DAMP	Ligandos PAMP
TLR1		Lipoproteínas triaciladas
TLR2	Proteínas de choque térmico	Peptidoglicanos Lipoproteínas Ácido Lipoteicoico Zymosan
TLR3	dsARN propio	dsARN viral
TLR4	Proteínas de choque térmico Fibrinógenos Heparán Sulfato Fibronectina Ácido Hialurónico HMGB1	Proteínas de choque térmico Lipopolisacáridos Proteína de fusión RSV Proteína de la envuelta MMTC (Virus de tumor mamario de ratón) Paclitaxel
TLR5		Fragelina
TLR6		Ácido Lipoteicoico Lipoproteínas triaciladas Zymosan
TLR7/TLR8	ssARN propio	ssARN viral
TLR9	DNA propio	DNA viral y bacteriano
TLR11		Profilina

Tabla 3. Principales ligandos (DAMPs y PAMPs) para cada TLR.

1.4.3.- Vías de señalización mediadas por los TLRs

El reconocimiento de PAMPs y DAMPs por parte del receptor induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR, como son MyD88 o TRIF, que inician una serie de vías de transducción de señales intracelulares que culminan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, IRFs, o proteínas MAP quinasas, que regulan la expresión de citoquinas, quimioquinas e interferones (IFNs) de tipo I. El desencadenamiento de todos estos eventos tiene como objetivo proteger al huésped frente a infecciones microbianas.

La respuesta específica iniciada por cada uno de los TLRs depende del reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR. Entre estas proteínas se encuentran MyD88 (Factor de Diferenciación Mieloide 88), esencial para la activación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR, TIRAP/MAL (MyD88-adaptor-like), TRIF (adaptador inductor de IFN- β), y TRAM (Molécula adaptadora relacionada

con TRIF) (Kawai and Akira, 2010). MyD88 es utilizado por todos los TLRs, excepto por TLR3. La unión a MyD88 activa una cascada de señales intracelulares que culmina en la activación de NF- κ B y MAP quinasas, llevando a la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . TLR3 y 4, por otro lado, utilizan TRIF como adaptador para activar una ruta alternativa que conduce también a la activación de NF- κ B e IRF3, llevando a la producción de interferón tipo I (IFN- β) y de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (Takeuchi and Akira, 2010) (**Figura 1.6**).

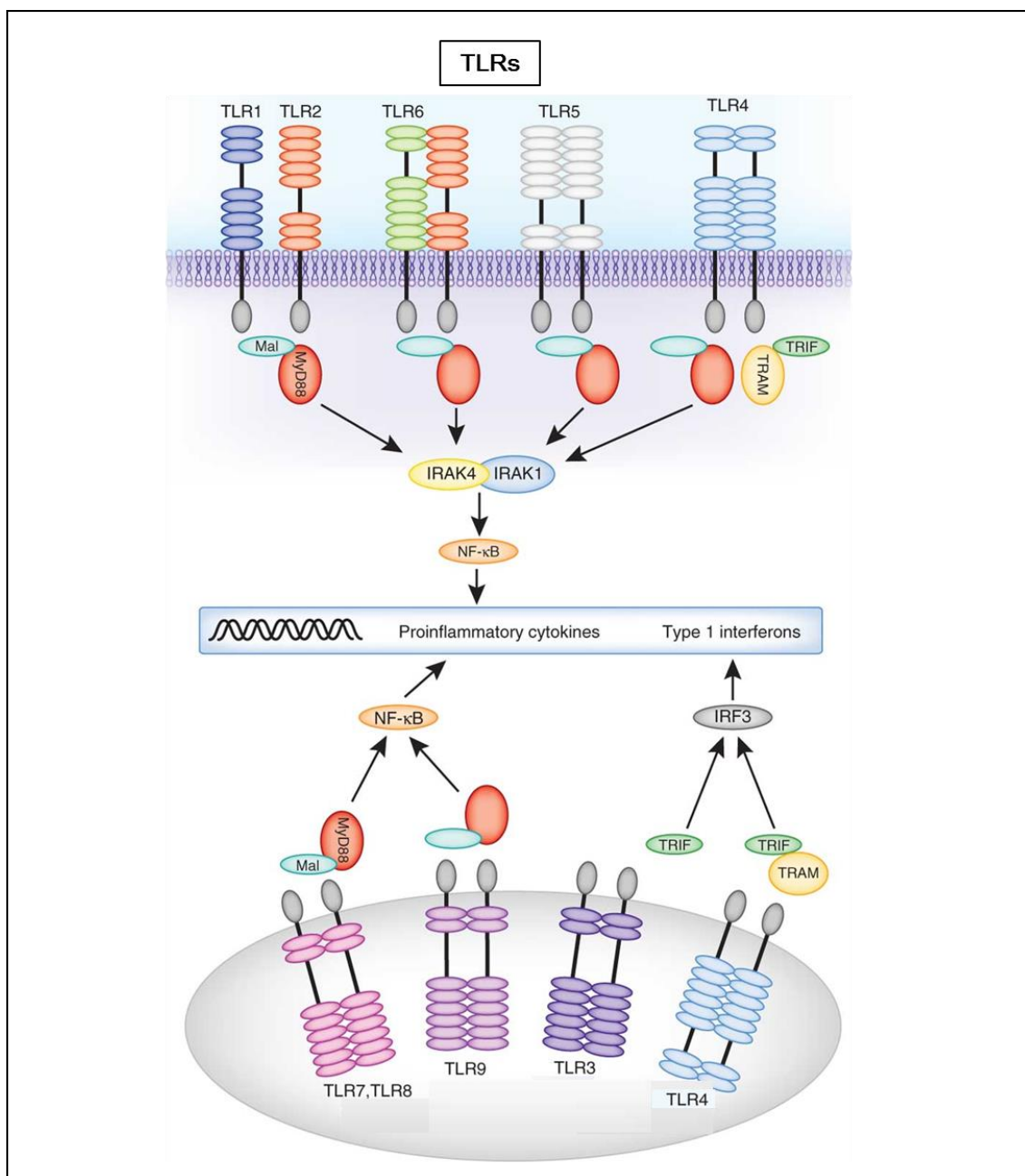


Figura 1.6. Clasificación de los TLRs en función de las vías de señalización intracelular que activan (Netea et al., 2012).

1.4.4.- *Toll-like receptor 4* (TLR4)

El receptor TLR4 fue el primer miembro de la familia de los TLRs identificado así como el mejor caracterizado hasta la fecha. En 1998 se identificó una mutación en el gen *tlr4* de distintas cepas de ratón que se asociaba con una respuesta reducida a la infección de bacterias gram negativas, más concretamente al lipopolisacárido bacteriano (LPS) de la pared de las mismas (Poltorak et al., 1998). Este hecho permitió describir su principal función, participar en el reconocimiento y respuesta frente a infecciones sistémicas bacterianas, principalmente las originadas por bacterias gram negativas. Dicho trabajo llevó a uno de sus autores, Bruce Beutler, a ser galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 2011.

Desde el punto de vista estructural, tras la síntesis de TLR4, éste forma un heterodímero al asociarse con el factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2), molécula cofactora requerida tanto para la translocación de TLR4 desde el Golgi a la superficie (Nagai et al., 2002), como para el reconocimiento de los ligandos. En el caso del reconocimiento de LPS, MD-2 es el encargado de reconocer un patrón estructural común en las moléculas de LPS; de hecho, la ausencia del cofactor impide el reconocimiento de dichos ligandos por parte de TLR4 (Shimazu et al., 1999).

El reconocimiento de LPS es muy complejo y requiere de dos proteínas accesorias: el *cluster* de diferenciación 14 (CD14) y la proteína de unión al lipopolisacárido (LBP) (Miyake, 2004). Ambas se encuentran ancladas a la membrana plasmática pero no presentan dominio citoplasmático, por lo que no son capaces de transducir señales al interior celular. Su función es únicamente presentar el LPS bacteriano al cofactor MD-2.

Para conocer el mecanismo por el cual la unión del ligando activa el receptor, se determinó su estructura cristalina lo que permitió observar que dicha unión inducía la formación de un heterotetrámero formado por dos copias de TLR4-MD-2 con conformación simétrica (**Figura 1.7**). La molécula de LPS interacciona con un bolsillo hidrofóbico de MD-2 a través de las cadenas lipídicas de su estructura, induciendo un cambio conformacional que permite la unión con el segundo heterodímero TLR4-MD-2 (Park et al., 2009) formando la estructura heterotetrámérica final.

Una excesiva respuesta a LPS puede llevar a complicaciones como shock séptico, fallo multiorgánico o la muerte del individuo (Waage et al., 1989). Por ello, tras

finalizar su función, el complejo TLR4 con LPS unido es endocitado por un mecanismo dependiente de dinamina y clatrina para posteriormente ser ubiquinado y marcado para su degradación en el proteasoma (Husebye et al., 2006).

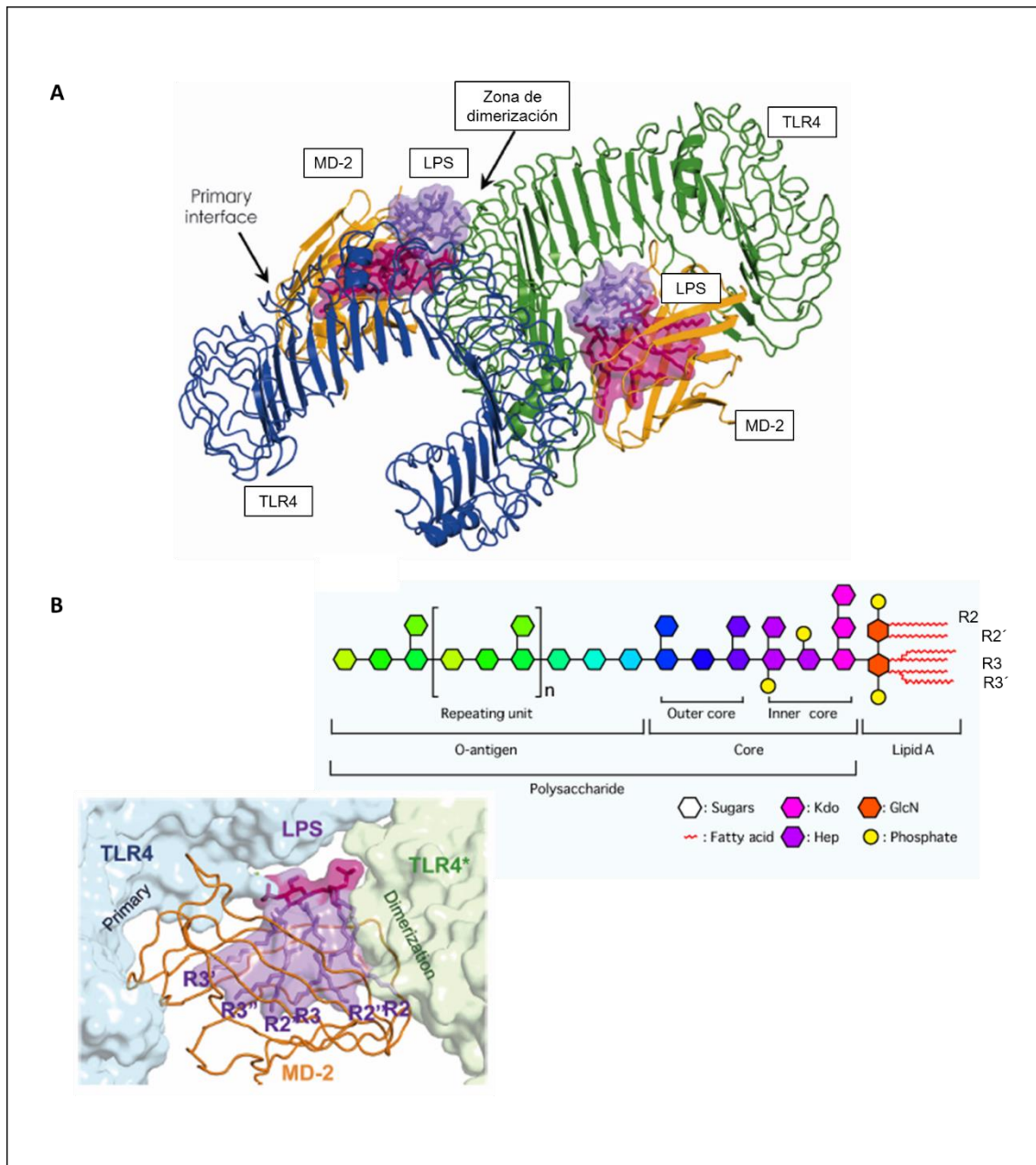


Figura 1.7. Estructura cristalina de TLR4 e interacción con su principal ligando LPS. (A) La unión del ligando induce la formación de un heterotetrámero constituido por dos copias de TLR4-MD-2 con conformación simétrica. (B) La molécula de LPS está constituida por tres regiones unidas covalentemente: el lípido A, un núcleo de oligosacáridos, y una cadena denominada antígeno O, también formada por azúcares. LPS interacciona con el bolsillo hidrofóbico de MD-2 a través de las cadenas lipídicas del lípido A (Modificado de Park et al, 2009).

A nivel de señalización, TLR4 es el único TLR capaz de reclutar las cuatro proteínas adaptadoras y activar dos rutas de señalización distintas: la ruta “dependiente de MyD88” y la ruta “dependiente de TRIF” (Kawai and Akira, 2010), es decir, el único TLR capaz de activar tanto la vía pro-inflamatoria como anti-inflamatoria (**Figura 1.8**).

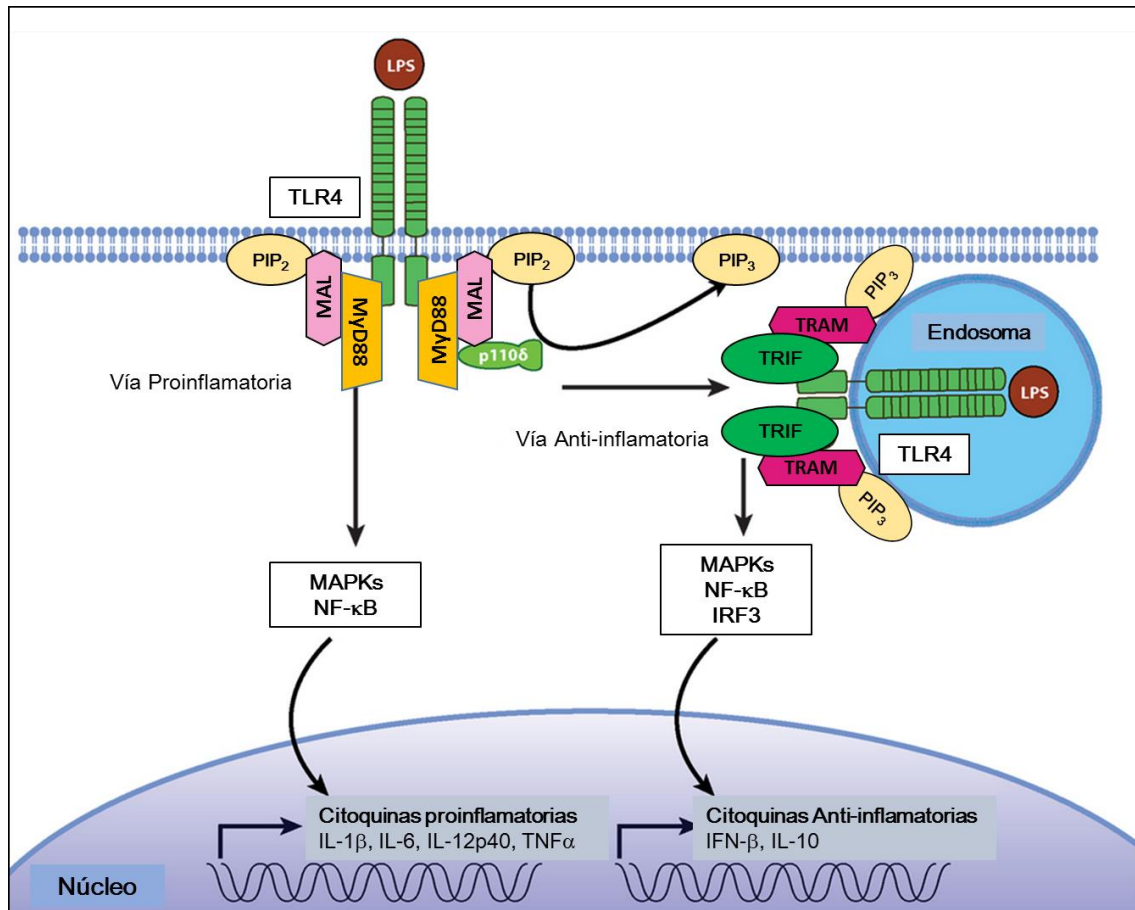


Figura 1.8. Regulación de las vías pro- y anti-inflamatorias activadas por TLR4. En un estado de reposo, las moléculas de fosfatidil inositol (PI) de la superficie celular se encuentran en forma de PIP₂ permitiendo el reclutamiento de MAL/TIRAP que contiene en su estructura un dominio de unión a PIP₂. Tras estimulación con LPS, la activación de TLR4 induce el reclutamiento de MAL/TIRAP y MyD88, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias a través de MAPK y NF-κB. La fosforilación de PIP₂ a PIP₃ por la isoforma p110δ de PI3K induce la translocación del complejo receptor-ligando a los compartimentos endosomales, donde TLR4 inicia su señalización a través de los adaptadores TRIF y TRAM y promoviendo la producción de IL-10 e IFN-β a través de MAPK, NF-κB e IRF3 (Modificado de Li et al, 2013).

Como se ha descrito anteriormente, tras la activación de los TLRs se induce una movilización en endosomas destinada a la degradación del receptor. Sin embargo, recientes estudios han revelado que, para el caso de TLR4, esta internalización tiene

dos propósitos, el conocido hasta ahora, y el de proceder con la segunda parte de la señalización. Se comprobó que, al inhibir la internalización de TLR4 en macrófagos, la fosforilación de IRF3 se bloqueaba completamente. Así, se dieron cuenta de que la internalización de TLR4 no servía sólo para inhibir la señalización mediante degradación, sino que permitía la activación de la vía anti-inflamatoria TRIF-TRAM y la inducción de interferón tipo 1 (Kagan et al., 2008; Tanimura et al., 2008). La internalización es mediada por la quinasa PI₃K, que induce la disociación de la proteína MAL de la membrana celular y su degradación por calpaína (Aksoy et al., 2012; Li et al., 2013).

1.4.5.- TLR4 e ictus

Distintos estudios recogidos hasta el momento acerca del papel de TLR4 en el ictus isquémico indican que la presencia de este receptor puede tener un papel dual: por un lado, su activación promueve una serie de eventos inflamatorios que exacerban el daño tisular y, por otro, parece estar implicado en procesos de neuroprotección a largo plazo.

Nuestro grupo de investigación describió, por primera vez, la implicación del receptor TLR4 en el daño cerebral inducido en la fase aguda de un ictus (Caso et al., 2007). Este trabajo demostró que los ratones deficientes en TLR4 presentaban un menor volumen de infarto así como mejores resultados en test neurológicos y comportamentales. A nivel molecular, estos animales presentaban una menor expresión tras ictus de IRF-1, MMP-9, NOS2 y COX-2, mediadores implicados en daño cerebral, lo que involucra una menor respuesta inflamatoria tras el insulto isquémico. Dichos resultados fueron verificados el mismo año, añadiendo a los anteriores datos una disminución de IL-6 y TNF- α en ratones deficientes en TLR4 tras un daño cerebral por isquemia-reperfusión (Cao et al., 2007).

Respecto al efecto de TLR4 sobre la proliferación microglial, un estudio reciente demostró, mediante estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) que, dos días tras una isquemia experimental, los animales deficientes en TLR4 presentaban una menor proliferación microglial en la zona de la corteza ipsilateral comparado con los animales *wildtype* (Moraga et al., 2016). Curiosamente, 14 días tras la isquemia, se ha descrito una mayor activación microglial en el cuerpo calloso ipsilateral de los animales

deficientes en el receptor (Tesis doctoral, Moraga, A, 2015). Asimismo, también se ha demostrado la participación de TLR4 en el desarrollo de tolerancia tras un preconditionamiento isquémico (Konstantinov et al., 2004; Pradillo et al., 2009).

Existen evidencias de la expresión TLR4 en casi todos los tipos celulares del SNC: en las células madre y progenitoras neurales (CMNs y CPNs) (Rolls et al., 2007; Ye et al., 2014), neuronas (Leow-Dyke et al., 2012; Wang et al., 2013), astrocitos (Gorina et al., 2011), oligodendrocitos (Bsibsi et al., 2002) y microglía (Yao et al., 2013). Los neuroblastos, por otro lado, son el único tipo celular cerebral que hasta el momento no ha demostrado expresión de TLR4 (Hassan et al., 2006; Moraga et al., 2014)

Además de en células cerebrales, los TLRs también se expresan en células circulantes como monocitos, neutrófilos y plaquetas. Este hecho hace que sea más difícil comprender los complejos mecanismos inflamatorios y/o resolutivos de su activación en el cerebro isquémico. El papel resolutivo de TLR4 es el menos conocido a fecha de hoy; sin embargo, hay evidencias que demuestran que la respuesta inflamatoria desencadenada por TLR4 podría desempeñar diferentes funciones como modulador de la neurogénesis (Moraga et al., 2014).

1.4.6.- TLR4 en neurogénesis tras ictus

A día de hoy, existe un gran debate sobre el papel dual de la inflamación como potenciador o supresor del proceso de neurogénesis (Russo et al., 2011). Estas discrepancias son debidas a que la inflamación, y su efecto en la neurogénesis, puede depender del tipo celular que se active, el entorno molecular o de la duración de la misma.

Los ligandos endógenos de TLR4 implicados en estos procesos de neurogénesis aún no han sido identificados. Sin embargo, distintos estudios con células inmunes sugieren que dicho receptor tiene la capacidad de responder de manera rápida frente a alteraciones en su microentorno, reconociendo componentes de la matriz extracelular así como sus productos de degradación. Algunos de estos componentes cuya liberación tras isquemia y así como su acción sobre TLR4 ha sido descrita, son:

- **HMGB1** (*High mobility group protein B1* o Proteína de Alta Movilidad del Grupo 1): es una proteína presente normalmente en el núcleo celular. Bajo condiciones isquémicas, actúa como un DAMP liberado al medio extracelular donde se unirá

a sus receptores TLR4, TLR2 y a la familia de receptores RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) (Kokkola et al., 2005; Yu et al., 2006). Tras una isquemia cerebral, esta molécula induce la sobreexpresión de MMP-9 a través de TLR4 (Qiu et al., 2010) y promueve la infiltración de células inflamatorias durante la fase aguda del ictus. Sin embargo, durante la fase crónica, media funciones resolutivas potenciando la plasticidad neuronal y la regeneración de distintas células de la unidad neurovascular (Hayakawa et al., 2010). Además, se ha descrito su implicación en angiogénesis y neurogénesis tras una hemorragia intracerebral (Lei et al., 2013), aunque su acción parece llevarse a cabo a través de la familia de receptores RAGE (Lei et al., 2015). Asimismo, su liberación por parte de los astrocitos promueve la proliferación de CMNs y CPNs en experimentos *in vitro* (Li et al., 2014; Qiu et al., 2010).

- **HSP60** (*Heat-shock protein 60* o proteína de choque térmico 60): en condiciones fisiológicas es una proteína con función chaperona, que ayuda al plegamiento de proteínas. Bajo condiciones de daño o estrés se libera como DAMP y se une a los receptores de superficie CD14 y CD40 y a TLR2 y TLR4. Se ha demostrado que, tras una isquemia cerebral focal, sus niveles en corteza cerebral se incrementan (Izaki et al., 2001). La implicación de las HSPs, y más concretamente de la HSP60 en neurogénesis ha sido demostrada a varios niveles, como en el bulbo olfatorio (Takaki et al., 2006) o en la retina (Morales et al., 1998).
- **HSP70** (*Heat-shock protein 70* o proteína de choque térmico 70): al igual que HSP60, tiene función chaperona. Ha sido descrito que su sobreexpresión lleva a un menor volumen de infarto tras un daño isquémico cerebral, es decir, tiene un efecto neuroprotector (Rajdev et al., 2000). Las funciones y los receptores de unión del ligando dependen de su localización; cuando HSP70 se encuentra unido a la membrana celular, va a activar de forma específica a las células NK a través de los receptores CD40; cuando HSP70 se libera al medio extracelular, se unirá específicamente a los receptores TLR2 y TLR4 ejerciendo efectos inmunorreguladores como la sobreexpresión de moléculas de adhesión,

moléculas co-estimuladoras o expresión de citoquinas y quimioquinas (Asea, 2008).

El **papel de TLR4** en neurogénesis en una **situación fisiológica** se describió en 2007 por Rolls y colaboradores. Este estudio demostró que la deficiencia en TLR4 en condiciones fisiológicas provocaba un incremento en la proliferación tanto en la ZSG como en la ZSV, así como un incremento en la diferenciación neuronal. Estas neuronas, sin embargo, no sobrevivían a largo plazo, presentando incapacidad para convertirse en neuronas maduras en un sistema *in vivo*, lo que parece indicar que las señales de supervivencia necesarias para completar el proceso neurogénico son dependientes en parte de TLR4 (Rolls et al., 2007).

En los últimos años, se han publicado algunos estudios que comienzan a dilucidar el posible **papel de TLR4** en los procesos de neurogénesis que se activan en la ZSV **tras una isquemia cerebral**, entre ellos, el publicado en 2014 por nuestro grupo de investigación (Moraga et al., 2014). En él se demostró que la deficiencia en TLR4 incrementaba la proliferación en la ZSV mediante un aumento del número de células de tipo C tardías (prominin-1⁺/EGFR⁺/nestina⁻) en la fase aguda del ictus, y que inducía un mayor número de células BrdU⁺ 7 días tras isquemia. Este aumento en la proliferación fue corroborado mediante estudios de PET, demostrando que la ausencia de TLR4 promueve proliferación celular en la ZSV ipsilateral 2 días tras el daño isquémico (Moraga et al., 2016). Curiosamente, 7 días tras la inducción del infarto, los neuroblastos correspondientes a los animales TLR4^{+/+} migraban distancias mayores desde la ZSV al área de daño a través del cuerpo calloso, alcanzando zonas más próximas a la lesión que en el caso de los neuroblastos de animales deficientes en el receptor. Sin embargo, a los 14 días de la isquemia, los animales TLR4^{-/-} presentaban un mayor número de neuroblastos en todas las zonas migratorias comparado con los animales TLR4^{+/+}, lo que sugiere que la deficiencia en TLR4 retrasa la migración de los progenitores neurales. Consistente con el anterior resultado, los ratones TLR4^{-/-} muestran un menor número de neuronas integradas en la corteza a los 14 y 28 días de la oclusión.

Recientemente, se ha demostrado la implicación de TLR4 en la recuperación cerebral promoviendo la angiogénesis y la neurogénesis tras hemorragia intracerebral (Lei et al., 2016). La administración de TAK-242, antagonista de TLR4, induce una disminución de VEGF, BDNF y MMP-9 en el estriado ipsilateral de las ratas, comparado

con el vehículo, tras una hemorragia intracerebral, y disminuye el número de células BrdU⁺ y DCX⁺ alrededor del hematoma generado. Asimismo, el antagonismo de TLR4 también inhibió la recuperación espontánea de las funciones neurológicas tras la hemorragia intracerebral.

Tal y como se ha descrito anteriormente, tras una isquemia experimental, la ausencia de TLR4 induce un menor número de células de tipo C tardías o pre-neuroblastos, que, tras diferenciarse a neuroblastos con capacidad migratoria se acumulan en las zonas por las cuales se desplazan para alcanzar la zona dañada. Esto, junto con la descrita disminución de la expresión de factores implicados en migración, como BDNF o MMP-9, explica la menor integración neuronal en la corteza peri-infarto de los animales deficientes en el receptor.

Otro estudio realizado sobre el papel de TLR4 en la neurogénesis, en este caso hipocampal, tras un traumatismo cerebral, demostró que la gran mayoría de células BrdU⁺ presentes en el hipocampo (96%) colocalizaban con el marcador de CMNs Sox-2 y también con TLR4⁺. Además, tras el daño cerebral, se producía un incremento temporal del número de células en proliferación, que se asociaba a una sobre-expresión de TLR4, demostrando que dicho receptor debe jugar un importante papel en la proliferación celular en el hipocampo tras un traumatismo cerebral (Ye et al., 2014). Esto implica que, en la ZSG, el papel de TLR4 en la proliferación celular es diferente al observado en la ZSV. Sin embargo, tal y como ha sido descrito en otros ámbitos, la función, el comportamiento y las vías de señalización activadas en ambos nichos neurogénicos, no siempre siguen el mismo modo de actuación (Brown et al., 2003; Ming and Song, 2011).

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Justificación

El ictus es una de las principales causas de mortalidad en el mundo así como la principal causa de discapacidad a largo plazo. Excepto la terapia trombolítica con r-tPA, de la que se benefician una media del 5% de los pacientes, no existe un tratamiento farmacológico establecido que permita reducir los déficits neurológicos causados por esta enfermedad.

Existen suficientes evidencias que demuestran que tras una isquemia experimental, se activan una serie de mecanismos neurorreparadores cuya finalidad es la regeneración del área dañada mediante la producción de nuevas neuronas. Este proceso ha sido descrito tanto en roedores (Arvidsson et al., 2002; Iwai et al., 2003; Jin et al., 2001; Thored et al., 2006; Yamashita et al., 2006; Zhang et al., 2001) como en humanos (Jin et al., 2006; Macas et al., 2006; Minger et al., 2007). No obstante, aunque exista un incremento de la neurogénesis, éste es insuficiente para compensar los déficits neurológicos en el paciente, aunque sí que es capaz de mejorar el pronóstico funcional del mismo (Lindvall and Kokaia, 2015). Por lo tanto, la necesidad de buscar estrategias terapéuticas que potencien de manera efectiva la neurogénesis endógena, permitirá incrementar la generación de nuevas neuronas funcionales requeridas para la reparación del tejido así como la restauración funcional tras la isquemia (Marlier et al., 2015; Tobin et al., 2014). Para conseguir lo anterior, es necesario conocer de manera exhaustiva como se modifica cada una de las etapas de la neurogénesis (proliferación de células madre neurales, migración de neuroblastos y diferenciación e integración neuronal) a lo largo del tiempo, así como la función e implicación de determinados receptores, en nuestro caso TLR4, en cada una de estas etapas.

2.2.- Hipótesis

Las tres principales fases del proceso de neurogénesis se modifican tras un ictus isquémico cortical con una alteración de las mismas a lo largo del tiempo que culmina en la integración neuronal en el area dañada. Asimismo, el receptor TLR4 está implicado en procesos de neurogénesis tras un ictus isquémico, tanto a nivel de la proliferación en la zona subventricular como en la migración eutópica y ectópica de los neuroblastos.

2.3.- Objetivos

Para demostrar dicha hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

2.3.1.- Estudio del perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV tras una isquemia cortical experimental en ratón.

- Análisis del perfil temporal de la proliferación en la ZSV.
- Estudio de las modificaciones de pH en LCR y plasma tras una isquemia experimental.
- Análisis del perfil temporal de la migración eutópica y ectópica de neuroblastos.
- Estudio de la diferenciación neuronal en la zona peri-infarto.

2.3.2.- Estudio del papel de TLR4 en procesos de neuroreparación tras una isquemia experimental.

- Estudio del efecto de TLR4 en la evolución del tamaño de infarto.
- Análisis del efecto de TLR4 en la proliferación en la ZSV en condiciones basales y tras isquemia experimental en modelos animales *in vivo* e *in vitro*.
- Análisis del efecto de TLR4 en las principales poblaciones neurales de la ZSV
- Estudio del efecto de TLR4 en la migración eutópica y sobre los mecanismos que regulan la migración ectópica de neuroblastos mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

Los compuestos empleados en la presente Tesis Doctoral se describen a continuación (**Tabla 4**):

- LPS (Invivogen) empleado como agonista específico de TLR4 (Chow et al., 1999).
- LPSRS (Invivogen) empleado como antagonista específico de TLR4 (Visintin et al., 2005)
- Proteína del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1) (eBioscience) como agonista de TLR4 (Maroso et al., 2010; Mittal et al., 2010).

Compuesto	Tipo de ligando	Concentración (ng/mL)
LPS	Agonista exógeno (PAMP/DAMP)	100
LPS-RS	Antagonista	100
HMGB1	Agonista endógeno (DAMP)	100

Tabla 4. Resumen de los compuestos testados en los experimentos *in vitro*.

3.2.- Modelos experimentales *in vivo*. Procesos quirúrgicos

3.2.1.- Animales de experimentación

En la presente Tesis Doctoral se usaron ratones C57BL/6, C57BL/10J (Harlan Laboratories Inc., IN) y C57BL/10ScNJ (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), ambos de 8 a 10 semanas de edad. Respecto a las dos últimas cepas, utilizadas en el bloque II, se generó un fondo mixto mediante el cruce de ambas. Los ratones heterocigóticos resultantes de esta cría se utilizaron para obtener los híbridos F2 TLR4^{-/-}, que no expresan el receptor TLR4 debido a una delección natural total del gen *tlr4*, y los híbridos F2 TLR4^{+/+}, que no expresan dicha mutación, por lo que serán considerados como cepa silvestre o *wildtype* (WT). Los animales se estabularon en condiciones controladas, con un ciclo de luz oscuridad 12/12h y con libre acceso a comida y agua.

Todos los protocolos experimentales *in vivo* se realizaron siguiendo las indicaciones del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con las directrices de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE.

3.2.2.- Anestesia y control de los animales

Los animales se anestesiaron en una atmósfera de N₂O/O₂ al 80%/20% respectivamente y una inducción inicial de isofluorano (IsoVet, Piramal Healthcare, Reino Unido) al 3%. Esta proporción de anestésico se rebajó al 2% en los momentos en los que los animales están siendo manipulados y se mantuvo entre el 1-1,5% cuando los animales se encontraban en mantenimiento o reposo. La temperatura de los animales fue controlada mediante una sonda rectal y un sistema de control de temperatura (Temperature control unit HB 101/2. Panlab, Harvard Apparatus, EE.UU.), manteniéndose durante todo el proceso a 37,0±0,5°C.

3.2.3.- Modelo de isquemia cerebral focal en ratón por ligadura

Para inducir en el ratón una isquemia experimental focal se realizó, debido a su relevancia clínica (para revisión ver, (Hossmann, 2009; Hossmann, 2012)), el modelo de oclusión permanente por ligadura siguiendo una variante del descrito originalmente por Chen y colaboradores (Chen et al., 1986). Concretamente, se llevó a cabo una oclusión en tándem de la arteria carótida común (ACC) y de la arteria cerebral media (ACM) izquierdas. Dicha oclusión da lugar a un infarto de tipo cortical que afecta fundamentalmente a la corteza somatosensorial.

Brevemente, el animal fue anestesiado siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.2.2. A continuación, tras realizar una incisión en la piel en la línea media del cuello, se retrajo el esternocleidomastoideo y las glándulas salivares exponiendo así la ACC izquierda. Ésta se aisló separándola del nervio vago y se ligó realizando un nudo con una seda 6/0. A continuación, el ratón fue colocado con la parte izquierda de la cabeza accesible, se realizó una incisión entre la oreja y el oído y se retiró el músculo temporal exponiendo el cráneo. Seguidamente se realizó una craneotomía en el hueso temporal en la zona en la cual se vislumbra la ACM por transparencia. Tras retirar las meninges, se procedió a ligar la ACM con una seda 9/0 (FSSB GmbH, Alemania), bien en su tronco, por debajo de la bifurcación principal (oclusión proximal), o en su rama posterior (oclusión distal), dependiendo del grupo experimental. La confirmación de la

oclusión se llevó a cabo con ayuda de una lupa binocular (PZMIV, World Precision Instruments, EE. UU.) observando la reducción del flujo sanguíneo (**Figura 3.1**).

Los animales a los cuales se les realizó la cirugía pero no así la oclusión de la ACC y la ACM se les denominó grupo *sham*.

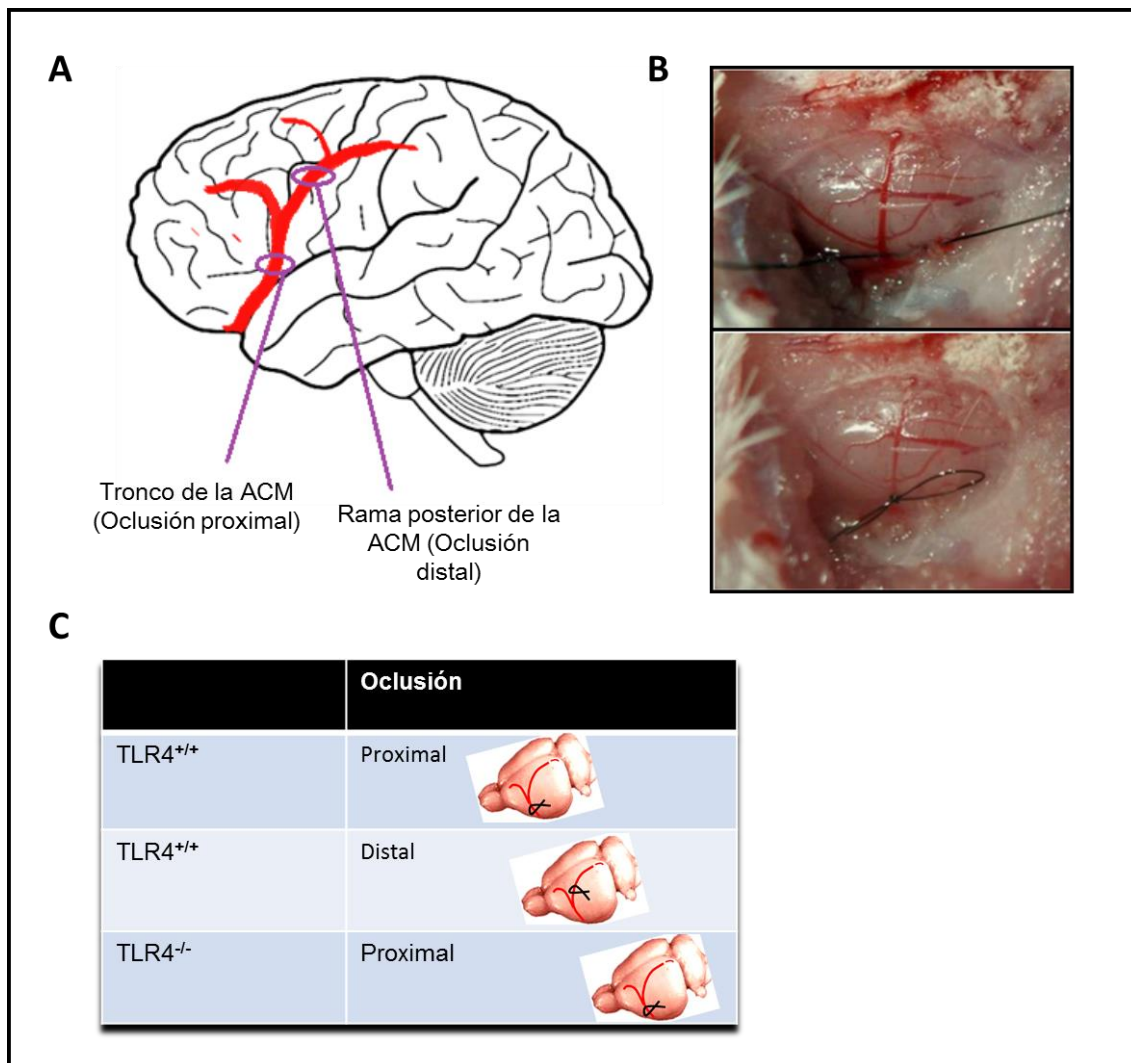


Figura 3.1. Modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media y grupos experimentales.

(A) Esquema de la disposición del tronco y la rama posterior de la ACM. (B) Imagen de la ACM antes y después de la realización de la oclusión proximal. (C) Tabla resumen de los grupos experimentales utilizados en la presente Tesis Doctoral.

3.2.4.- Cuantificación del volumen de infarto

La determinación del volumen de infarto se llevó a cabo mediante la realización de imágenes de resonancia magnética (IRM) basada en la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) a las 24 horas de la isquemia experimental. Para la obtención

de imágenes de resonancia potenciadas en T2 (T₂W) se utilizó el equipo ICON 1T (Bruker BioSciences Corporation, Ettlingen, Alemania). Las imágenes obtenidas son procesadas y analizadas posteriormente con el software Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

El volumen de infarto se expresa como porcentaje de hemisferio que presenta el área infartada y se calcula como describen previamente Hernández-Jimenez y col. (Hernandez-Jimenez et al., 2013). Se analizaron 12 imágenes equidistantes separadas por 500 µm (un total de 6 mm en el eje rostro-causal) desde 2.5 mm hasta -3,5 mm de bregma, por medio de la cuantificación del área de los hemisferios ipsilesionales y contralesionales así como el área infartada. Para el cálculo de porcentaje de hemisferio infartado se usó la siguiente formula:

$$\% \text{ Hemisferio infartado} = \frac{\text{Vol infarto}}{\text{Vol Contralateral}} \times 100, \text{ siendo Vol infarto} = \frac{\sum \text{Área infartada}}{\text{Íe}}$$

$$\text{Íe (Índice de edema)} = \frac{\text{Área ipsilateral}}{\text{Área contralateral}} \quad \text{Y,} \quad \text{Vol Contralateral} = \sum \text{Área contralateral}$$

Asimismo, para el seguimiento del volumen de infarto de los animales que se sacrificaron a 7 y 14 días, se realizó una tinción de Nissl. Los animales se perfundieron con tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 a un flujo de 5 mL/min durante 5 min y a continuación se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 4% a mismo flujo y durante el mismo tiempo. Tras extraer el cerebro, este se mantuvo durante una noche en PFA 4% para post-fijación, seguido de 2 días en solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0.1 M. Por último, los cerebros se congelaron en isopentano y se cortaron en secciones coronales de 40 µm con ayuda de un microtomo de congelación (Leica SM2000R, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Tras colocar 15 secciones separadas 320 µm en un portaobjetos *superfrost* (Thermo Scientific), estas se sumergieron en una solución de acetato de violeta de cresilo (Sigma-Aldrich) al 0,5%. El colorante accede al interior de las células tiñendo los cuerpos de Nissl, que se corresponden con cúmulos de retículo endoplasmático rugoso. Este orgánulo celular se tiñe con violeta de cresilo (colorante básico) por su gran concentración de ribosomas y, por tanto, de ARNr y ARNm en proceso de traducción. Una vez teñidas, las muestras fueron sometidas para su deshidratación a una graduación creciente de alcoholes (75%, 90% y 100% etanol).

Posteriormente se sumergieron en xileno (Sigma-Aldrich) y finalmente se montaron en medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich).

La cuantificación del volumen de infarto mediante la técnica de Nissl 7 días después de la isquemia experimental se realizó de manera similar a la cuantificación de las imágenes T₂W de RMN descrita anteriormente. El estudio del infarto 14 días tras isquemia se llevó a cabo mediante el análisis de la pérdida de corteza producida en el hemisferio ipsilateral, también utilizando la tinción de Nissl. Para ello se cuantificó el área del hemisferio contralateral y del hemisferio ipsilateral sano (tejido viable). La pérdida de corteza se cuantifica mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de corteza} = \sum \text{Área hemisferio contralateral} - \sum \text{Área hemisferio ipsilateral sano}$$

3.2.5.- Extracción de plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR). Análisis de pH y composición mediante estudios de RMN-metabolómica

La obtención de plasma sanguíneo se llevó a cabo en el momento del sacrificio de los animales mediante extracción del máximo volumen de sangre posible mediante punción cardiaca en un 10% de citrato. A continuación, la sangre se centrifugó 5 min a 1200 g y 4°C, obteniendo así el plasma, que se conservó a -80°C hasta el análisis de su pH.

El proceso de extracción de LCR se llevó a cabo como describieron previamente Liu y colaboradores (Liu and Duff, 2008). El animal se anestesió siguiendo el protocolo descrito anteriormente y se colocó sobre un instrumento estereotáxico para impedir cualquier movimiento durante la extracción, con la zona occipital accesible. Se realizó una incisión sagital de la piel del cuello desde la zona correspondiente al hueso occipital hasta la parte inferior del cuello y se retiró, con ayuda de un microscopio de disección, el tejido subcutáneo y los músculos cervicales. El cuerpo del animal fue colocado formando un ángulo de cerca de 135° con la cabeza, de manera que se vislumbre la duramadre de la cisterna magna, teniendo ésta una estructura de triángulo inverso brillante y claro a través del cual se observa un vaso sanguíneo principal (arteria dorsal espinal) y el espacio que contiene el LCR rodeando la misma (**Figura 3.2**).

Se introdujo con mucho cuidado una jeringa de 0.3 mm (BD Biosciences) de manera casi paralela a la duramadre en la cisterna magna en la zona más alejada

posible a la arteria dorsal, y se absorbió ligeramente para obtener el LCR transparente. El volumen obtenido en cada extracción fue aproximadamente de 10 μ L. Para obtener un volumen suficiente de muestra para realizar las medidas de pH y del espectro de metabolómica, se realizó un *pool* de 3 animales por condición para obtener así un volumen total de LCR de entre 25-30 μ L.

Las medidas de pH del plasma y LCR se realizaron utilizando el pHmetro Basic-20 (Crison), mientras que el espectro de RMN del LCR se llevó a cabo en un espectrómetro Bruker Ultrashield 700 MHz (Germany) a 4°C en agua deuterada como disolvente.

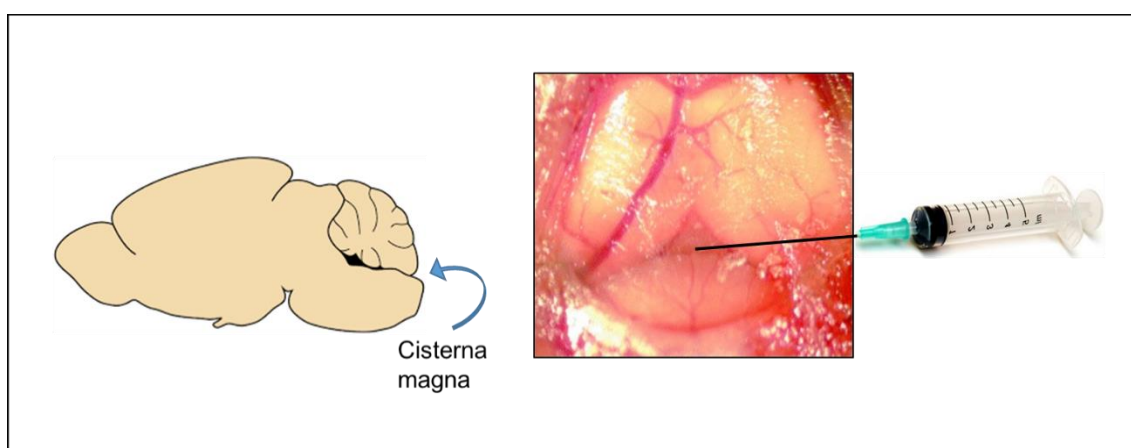


Figura 3.2. Esquema de la localización de la cisterna magna y lugar de inyección para la extracción de LCR en un ratón adulto.

3.3.- Modelos experimentales *in vitro*. Cultivos celulares

3.3.1.- Aislamiento, cultivo primario y expansión de neuroesferas de ratón adulto de la ZSV

El aislamiento y cultivo de las células madre neurales (CMNs) de la zona subventricular (ZSV) de ratones adultos se realizó tal y como se ha descrito previamente (Azari et al., 2010).

Los animales de las cepas anteriormente citadas se sacrificaron por dislocación cervical y sus cerebros se aislaron en condiciones estériles. La ZSV fue extraída y troceada en una solución enzimática compuesta por 0.9 mg/mL de papaína, 170 mg/mL de L-Cisteína y 170 mg/mL de EDTA (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo EBSS (Gibco), incubando el tejido durante 30 min a 37°C para su digestión. Finalizada la incubación,

la papaína se inactivó mediante la adición del doble del volumen inicial de medio de cultivo basal (Neurobasal medium, Stem Cell Technologies) complementado con suplemento de proliferación (Stem Cell Technologies) y un 5% de penicilina-estreptomicina (Gibco).

El tejido digerido se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Tras desechar el sobrenadante, el tejido se resuspendió en 1 mL de medio completo y se disoció mediante disgregación mecánica con pipeta P1000 y posteriormente P100 hasta obtener una suspensión de células individualizadas. Las células se pasaron por un filtro de 40 μm y, tras una nueva centrifugación, el pellet fue resuspendido en medio completo de proliferación suplementado con los factores de crecimiento EGF 20 ng/mL, bFGF 10 ng/mL y 1 $\mu\text{L/mL}$ de 0,2% de heparina (Stem Cell Technologies).

Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 7-9 días obteniendo de ellas neuroesferas primarias. La expansión de las neuroesferas se realizó a partir de neuroesferas primarias de aproximadamente 100 μm de diámetro. Dichas células se aislaron en un tubo Falcon de 15 mL y, tras centrifugar y retirar el sobrenadante, se añadieron 200 μL de una solución con enzimas proteolíticas y colagenolíticas (Accutase, Stem Cell Technologies) en el que se incubaron las neuroesferas durante 5 min a 37°C. Las enzimas se inactivaron mediante la adición de medio completo de proliferación, y se pipeteó hasta obtener una suspensión unicelular. Las células se pusieron de nuevo en cultivo en las condiciones de incubación citadas anteriormente hasta obtener el diámetro de neuroesfera necesario para una nueva expansión. A cada expansión de neuroesferas se le denominó *pase* y los experimentos *in vitro* se realizaron siempre entre los pases 2 y 3.

3.3.2.- Aislamiento y cultivo primario de astrocitos corticales de ratón neonato

Los cultivos primarios enriquecidos en astrocitos se prepararon a partir de cortezas cerebrales de ratones C57BL/10 y C57BL/10ScNJ postnatales de un día de edad (P1) (Hurtado et al., 2005). Por cada cultivo se usaron 3-4 neonatos.

Los neonatos se sumergieron en EtOH 70% y posteriormente en PBS. Se decapitaron y las cabezas fueron situadas en una placa Petri P100 con medio L15 Leibovitz (Gibco) sobre una superficie con hielo. Se extrajeron los cerebros y, con ayuda de una lupa binocular, se retiraron las meninges y se separaron las cortezas. Dichas

cortezas fueron transferidas a una placa Petri con medio de cultivo BME (Basal Medium Eagle) suplementado con 10% medio de AG y 10% de suero fetal bovino, al que denominaremos a partir de ahora como medio de astrocitos. El medio AG, a su vez, está compuesto por 0.4% glutamina, 3% glucosa (Sigma-Aldrich) y 5% penicilina-estreptomicina (Gibco) en medio BME.

Una vez aisladas, las cortezas se disgregaron mecánicamente con ayuda de unas microtijeras, posteriormente con una pipeta P1000 y finalmente con pipetas estrechadas de vidrio hasta conseguir una suspensión unicelular. A continuación, la suspensión se transfirió a un Falcon de 15 mL al que se le añade PBS hasta 11 mL, y se centrifugó a 900 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Tras retirar el sobrenadante por decantación, el *pellet* se resuspendió en medio de astrocitos. El medio se cambió a las 24 horas del cultivo y posteriormente cada 2 días hasta que el cultivo llegara a confluencia.

El cultivo confluyente se mantuvo en agitación durante 12-16 horas a 37°C a 90 rpm. Durante este paso del proceso, la microglía presente en el cultivo se despegaba de la superficie del *flask*, lo que permite obtener un cultivo puro de astrocitos. Así, se retiró el medio y con él la microglía en suspensión, se hizo un lavado con PBS atemperado para eliminar los restos de suero y se tripsinizó. La tripsina 0,05%/EDTA 0,02% se dejó actuar dentro del incubador y en agitación durante un tiempo aproximado de 5 min hasta que se observa que las células se desprenden de la superficie del *flask*. Tras añadir un volumen equivalente de medio, recuperamos la suspensión que se centrifugó 5 min a 900 rpm. Finalmente, los astrocitos se sembraron en *flasks* o placas pretratadas con poli-L-lisina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich). El medio fue cambiado cada 2-3 días hasta obtener una confluencia cercana al 80%. En ese punto se añadió al medio dibutiril-AMPc (Sigma-Aldrich), un activador que permite que, en aproximadamente 5-7 días, los astrocitos adquieran un fenotipo activado, con mayores prolongaciones.

3.3.3.- Estudio de la viabilidad celular en los cultivos celulares

La viabilidad de los cultivos se monitorizó de manera rutinaria mediante tinción con azul de Tripán (Sigma-Aldrich) y/o mediante la cuantificación de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los experimentos de toxicidad de los compuestos testados.

La cuantificación de la muerte celular se realizó mediante la medida de la actividad enzimática de la enzima LDH, una enzima citosólica estable que es liberada al medio de cultivo como consecuencia de la lisis celular. Para proceder al ensayo, se tomaron muestras del medio de cultivo así como de células lisadas mediante PBS–Tritón al 0,1% durante 30 minutos a 37°C (control de 100% de lisis), 24 horas después del tratamiento con los ligandos en cuestión o con el medio con el pH modificado, evaluándose la actividad mediante el kit comercial CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity (Promega) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La actividad de la LDH se determinó mediante la medida de absorbancia a 492 nm, siguiendo la oxidación del NADH (disminución en la absorbancia) en presencia de piruvato (Koh and Choi, 1987) en un lector de placas Sunrise™ (TECAN). La liberación de la LDH se expresa como el porcentaje de la LDH celular liberada por el tratamiento respecto al total debido a la lisis celular.

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = \frac{\text{Liberación de LDH experimental}}{\text{Liberación de LDH máxima}} \times 100$$

3.4.- Estudios de proliferación *in vivo*. Aislamiento y caracterización de células madre y progenitoras neurales en la ZSV

3.4.1.- Cuantificación de células en fase proliferativa en la ZSV

Para analizar el estado proliferativo de las células presentes en la ZSV, se realizaron inmunofluorescencias empleando los marcadores Ki67 o fosfohistona H3 (pHis3).

Ki67 es un antígeno nuclear que se encuentra en células en las fases activas del ciclo celular (fases G1, S, G2 y M). La inmunohistoquímica se realizó sobre 5 secciones de cerebro de 40 µm de grosor separadas entre sí 320 µm. La zona analizada corresponde desde 1,70 mm a 0,1 mm de bregma. Se realizaron lavados iniciales con PBS para eliminar restos de anticongelante en las secciones y posteriormente se procedió a la incubación con solución de bloqueo para evitar uniones inespecíficas (PBS, Triton X-100 al 0,3% y 10% *normal goat serum* (NGS)). A continuación se incubó durante 16-20 horas con el anticuerpo primario frente a Ki67, producido en conejo, disuelto en la solución de bloqueo previamente descrita. Tras realizar tres lavados con PBS-Triton X-100 0.3% para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubó durante dos

horas con el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 producido en cabra. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS y los cortes fueron colocados en un portaobjetos y cubiertos tras adicionar medio de montaje de fluorescencia *Aqua Poly/Mount* (Polysciences Inc.).

La cuantificación de las células Ki67 positivas se realizó tal y como se describió previamente (Pradillo et al., 2016) mediante imágenes tomadas en un microscopio confocal ZEISS LSM710 asociado al *software* de análisis ZEN 2008 (Carl Zeiss Microimaging GmbH.).

Se tomaron 4 fotos a 20X (421 μm^2) por sección distribuidas como se muestra en la **figura 3.3**. Las imágenes analizadas son un *stack* de 6 proyecciones horizontales separadas 4 μm . La intensidad de la fluorescencia de las imágenes fue densitometrada utilizando el software de imagen Volocity 6.3 (PerkinElmer Life Sciences).

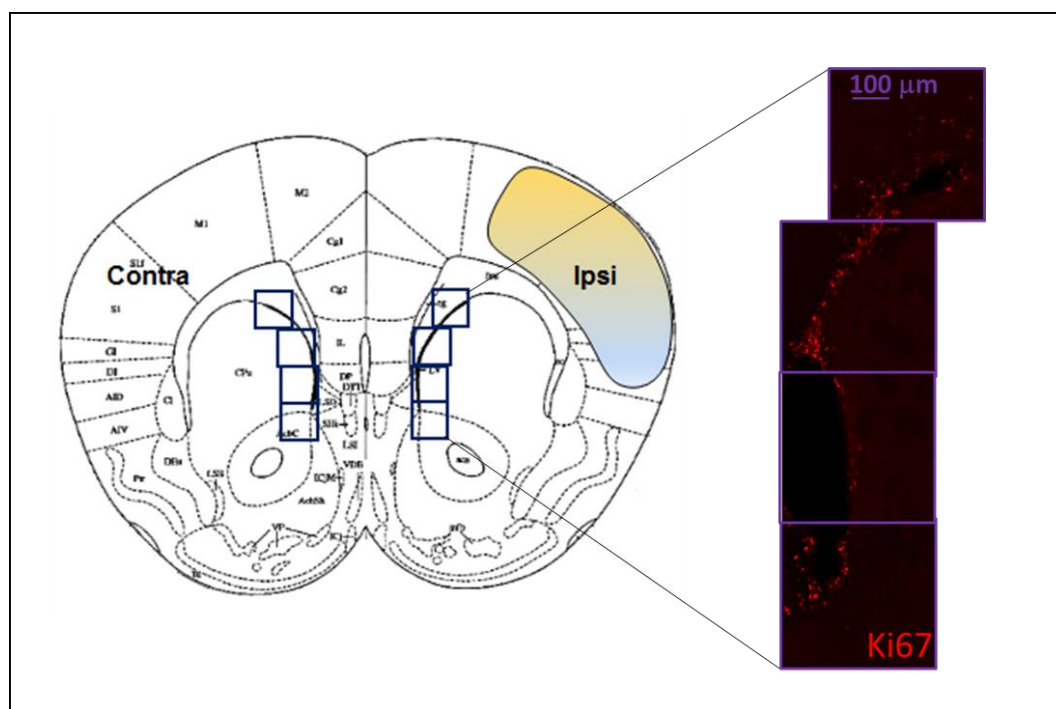


Figura 3.3. Representación esquemática de la cuantificación de las células Ki67+ en la ZSV. Se toman 4 imágenes consecutivas a 20X con un microscopio confocal para cubrir toda la extensión de la ZSV. Las imágenes se analizan posteriormente por densitometría utilizando el *software* Volocity 6.3.

Por otra parte, la inmunohistoquímica frente a pHis3 reconoce la Ser10 de la histona H3 fosforilada, lo que permitió observar las células que se encuentran en fase de mitosis (fase M). La inmunofluorescencia se realizó como se describe anteriormente

empleando en este caso un anticuerpo primario frente a pHis3 producido en conejo y el anticuerpo secundario anti-conejo Cy3 producido en cabra. La cuantificación de las células pHis3 positivas se llevó a cabo mediante estereología empleando un microscopio de fluorescencia óptico (Nikon Eclipse 80i, Nikon Corporation) asociado al *software* Stereo Investigator 6 (MicroBrightfield Inc.). El volumen total de la extensión dorsolateral de la ZSV se estimó mediante aplicación del principio de Cavalieri utilizando la técnica de “Cavalieri Estimator” sobre 5 secciones seriadas por cerebro de 40 μm de grosor separadas 320 μm , correspondiendo a la zona comprendida entre 1,70 a 0,1 mm tomando como 0 el punto bregma. El criterio morfológico que se sigue para la delineación de la ZSV es el descrito en Gonzalez y col. (Gonzalez et al., 2007). Por otro lado, la estimación estereológica del número total de células pHis3⁺ se realizó en el área seleccionada anteriormente usando el método del fraccionador óptico (Gundersen et al., 1988) (Figura 3.4).

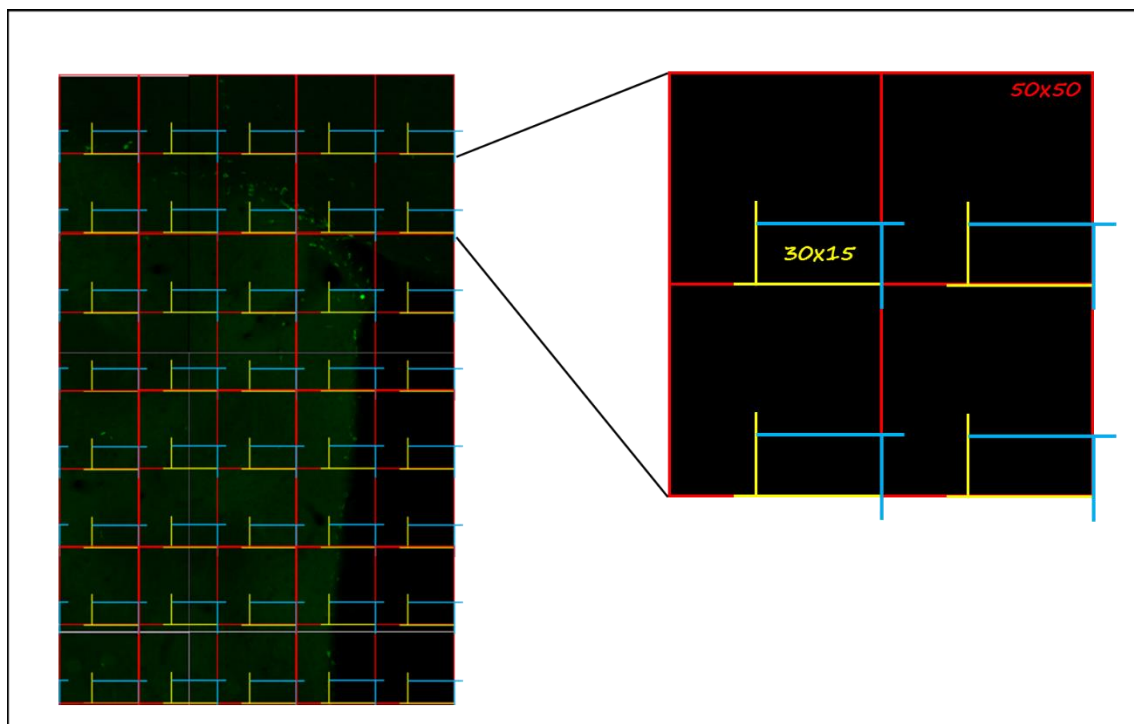


Figura 3.4. Representación esquemática de la cuantificación de las células pHis3⁺ en la ZSV y parámetros empleados para el conteo estereológico.

3.4.2.- Disgregación mecánica y enzimática y tratamiento de la suspensión celular para citometría

A las 24 horas de realizar la isquemia cerebral experimental los ratones se sacrificaron y se aisló la ZSV ipsilesional. Para aislar los progenitores neurales de la

misma, se empleó el kit de disgregación enzimática “Neural tissue dissociation kit” basado en una disgregación con papaína, simultáneamente a una disgregación mecánica con “Gentle MACS dissociator”, ambos de Miltenyi Biotec. El protocolo que se siguió es el descrito por Kaiser y col. (Kaiser et al., 2013). El tejido aislado se colocó en 1 mL de PBS frío y se sometió a consecutivas rondas de disgregación mecánica y enzimática hasta obtener una suspensión de células individualizadas. La suspensión se incubó inicialmente con *Fc Blocking Reagent* (Miltenyi, Biotec, Madrid, España) en solución de bloqueo PBS-BSA 5% para bloquear las uniones inespecíficas y, posteriormente, con los anticuerpos que marcan las proteínas de interés así como con los correspondientes controles isotípicos durante 45 min a 4°C (Tabla 5). Para los marcadores intracelulares las células se permeabilizaron y fijaron con BD Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) previamente a la incubación con el anticuerpo siguiendo el protocolo proporcionado en el kit. Se realizaron lavados para eliminar los anticuerpos no unidos y las células se resuspendieron en FACS-Flow (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA).

Población	Anticuerpo	Casa Comercial	Concentración
Tipo B/Tipo C	PE Anti-Prominina-1	Miltenyi Biotec, Madrid, España	1:100
Tipo B/Tipo C	FITC anti-EGFR	Invitrogen, Life Tech, Madrid, España	1:100
Tipo B	Rat anti-GFAP	Invitrogen, Life Tech, Madrid, España	1:100
Tipo C	Mouse anti-MASH-1	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA	1:100
	Isotipos		
	FITC Rat IgG2b	Biologend	1:100
	Rat IgG1-PE	Miltenyi Biotec, Madrid, España	1:100
	Goat Anti-Rat Alexa 647	Jackson ImmunoResearch	1:100
	Goat Anti-Mouse Alexa 647	Jackson ImmunoResearch	1:100

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para los experimentos proliferación mediante citometría de flujo.

3.4.3.- Análisis de células madre y progenitoras neurales (CMNs y CPNs) por citometría de flujo

La adquisición de muestras se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo FACScalibur® (Becton Dickinson S.A.) acoplado al software BD CellQuest Pro (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) siendo los parámetros de adquisición definidos en función del tamaño y la complejidad celular de las poblaciones analizadas. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa FlowJO (Tree Star inc.).

Se analizaron las poblaciones de CMNs y CPNs de la ZSV estableciendo los siguientes criterios: se considera el conjunto de CMNs y CPNs las células viables de la ZSV que expresan prominina-1 (Walker et al., 2013). Dentro de esta clasificación se distingue entre CMNs y CPNs no proliferativas (que se mantienen en un estado de quiescencia), caracterizadas por ser prominina-1⁺ y EGFR⁻, y proliferativas, caracterizadas por ser prominina-1⁺ y EGFR⁺. Dentro del grupo de células quiescentes se encuentran las células de tipo B quiescentes (prominina-1⁺, EGFR⁻ y GFAP⁺) y, dentro del grupo de células proliferativas, se encuentran las células de tipo B activadas (prominina-1⁺, EGFR⁺ y GFAP⁺) y las células de tipo C (prominina-1⁺, EGFR⁺ y Mash1⁺). Todos los subgrupos se cuantificaron como porcentaje respecto al total de células prominina-1⁺.

3.5.- Estudios de proliferación *in vitro*

Las neuroesferas primarias fueron disgregadas siguiendo el protocolo de acutasa descrito previamente y puestas en cultivo en una placa de 6 pocillos. Fueron cultivadas a una concentración de 5000 células/mL durante 5 días; la proliferación de las mismas se analizó tomando fotos de 25 campos aleatorios por pocillo de cada condición. El diámetro de unas 60-80 neuroesferas por pocillo fue cuantificado con el software Image J.

3.6.- Estudios de migración *in vivo*

3.6.1.- Análisis densitométrico de la ruta migratoria de neuroblastos a partir de imágenes de microscopía confocal

Los estudios de migración de neuroblastos se llevaron a cabo mediante cuantificación del volumen de células positivas a doblecortina (DCX⁺), una proteína asociada a los microtúbulos expresada en neuroblastos. Para ello se realizó una inmunofluorescencia empleando el anticuerpo anti-DCX producido en cabra (Santa Cruz), seguido de un anticuerpo secundario biotinilado frente a cabra y un revelado final con estreptavidina conjugado con Alexa-488.

Para analizar la migración se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de 14 µm en formato *z-stacks* a 20X de las distintas zonas analizadas: área de migración eutópica y área de migración ectópica (zona rostral y zona caudal) (**Figura 3.5**) y se analizaron por densitometría mediante el software Volocity 6.3.

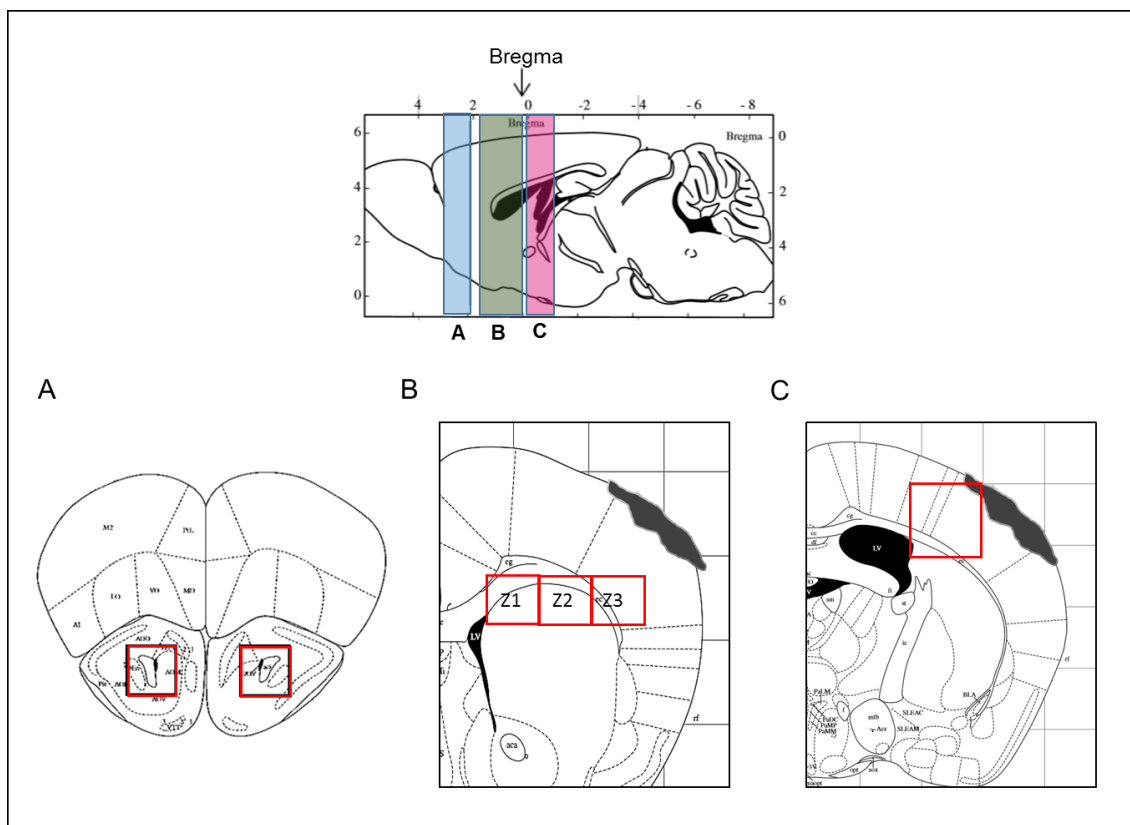


Figura 3.5. Representación esquemática de las zonas de cuantificación de los neuroblastos (células DCX⁺). (A) En la imagen se representa la zona de migración fisiológica, también denominada eutéptica o rostral, (B) la zona rostral de la migración ectópica y, (C) la zona caudal de la misma.

El estudio de la migración eutéptica rostral se realizó tomando imágenes de dos secciones consecutivas separadas 320 μ m comenzando a 2 mm de bregma.

Por otro lado, el análisis de la migración ectópica de neuroblastos en la *zona rostral* se realizó en 5 secciones consecutivas en la zona comprendida entre 1,70 y 0,1 mm tomando como 0 el punto bregma. En cada sección se fotografió la zona subventricular (Z1) y, a continuación, otras dos imágenes contiguas a lo largo del cuerpo calloso hacia la corteza del hemisferio analizado (Z2 y Z3).

Para finalizar, el análisis de la *zona caudal* se llevó a cabo en 3 secciones consecutivas separadas 320 μ m comenzando en bregma y finalizando a - 0,96 mm de dicho punto. Se tomaron entre 2-4 imágenes por hemisferio en la zona dorsolateral de los ventrículos laterales con marcaje DCX⁺.

3.6.2.- Aislamiento y extracción de ARN de corteza cerebral

Se sacrificaron animales de los distintos grupos experimentales como se describe previamente para proceder a la extracción de la corteza ipsilesional (*core* más periinfarto). El tejido fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Para la extracción de ARN se añadió tampón de lisis RLT con β -mercaptoetanol (1:100) sobre el tejido congelado y se realizó una disgregación, inicialmente con puntas de pipeta P1000 y posteriormente con jeringas de 25G. Para homogeneizar la suspensión se utilizaron columnas QIAshredder (QIAGEN). A continuación, se extrajo el ARN total utilizando las columnas de RNeasy Mini kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

La concentración de ARN fue cuantificada usando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

3.6.3.- Análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR

Se sintetizó ADNc a partir de ARN total utilizando el kit *Transcriptor Universal cDNA* (Roche). Por cada 1 μ g de ARN en un volumen de 15 μ L, se añadió 4 μ L de tampón de reacción (5X) y 1 μ L de enzima transcriptasa inversa (20X), obteniendo aproximadamente 1 μ g de ADNc.

El protocolo seguido para la obtención de ADNc fue el siguiente: 25°C durante 10 min, 55°C durante 10 min, 85°C durante 5 min y mantenimiento a 4°C.

Para analizar la expresión de ARNm de distintas moléculas implicadas en el proceso de migración de neuroblastos se realizaron RT-qPCRs. El volumen final de cada reacción fue de 20 μ L, incluyendo 2 μ L de ADNc, 2 μ L de solución de trabajo de cebadores (10 ng/mL del directo y 10 ng/mL de inverso) (**Tabla 6**), 6 μ L de H₂O y 10 μ L de Power SyBRGreen PCR Master Mix (Life Technologies). En cada reacción de RT-PCR se utilizaron entre 20 y 40 ng de ADNc y cada medida se realizó siempre por triplicado. La RT-qPCR se llevó a cabo en el equipo iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System y el análisis de datos empleando el software iQ5, ambos de BIO-RAD.

El programa de la RT-qPCR consistió en 5 min a 9°C seguidos de 50 ciclos de 9°C durante 10 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 40 s. A continuación, se realizaron 81 ciclos de 55°C durante 10 s para realizar la curva de *Melt*. Al final de cada ciclo el termociclador registra la fluorescencia emitida por el SYBR Green al interaccionar con el dsADN. Dicha fluorescencia irá aumentando a medida que se sintetice el ADN.

La cuantificación se llevó a cabo a partir de los valores de ciclo umbral (Ct). El Ct representa el número de ciclo para una determinada línea base, en la cual el incremento de fluorescencia (y por tanto el de ADN) es exponencial. La línea base que se utilizó para obtener los Ct fue asignada por defecto por el sistema.

Los valores de Ct obtenidos para cada gen (Ct_{gen}) fueron normalizados con el Ct obtenido para un gen de referencia ($Ct_{referencia}$) utilizando la siguiente fórmula:

$$Ratio = 2^{-(Ct_{gen} - Ct_{referencia})}$$

De este modo, la *ratio* refleja la expresión relativa de un gen en estudio en comparación con el gen de referencia. En este caso, el gen de referencia fue el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima que se expresa de forma constitutiva e igual en todas las células.

Gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
IL6	TGGCTAAGGACCAAGACCATCCAA	AACGCACTAGGTTTGCCGAGTAGA
MCP-1	AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA	ATGTCTGGACCCATTCTTCT
SDF-1 α	CAGAGCCAACGTCAAGCA	AGGTACTCTTGGATCCAC
BDNF	GGGTCACAGCGGCAGATAA	GCCTTTGGATACCGGGACTT
VEGF	TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA	TTTCTCCGCTCTGAACAAGGCTCA
IL-1 β	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
MMP9	GCCGACTTTTGTGGTCTTCC	CTTCTCTCCCATCATCTGGGC
GAPDH	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA

Tabla 6. Secuencias de los cebadores directos e inversos de IL-6, MCP-1, SDF-1 α , BDNF, VEGF-A, IL-1 β , MMP-9 y el control de normalización GAPDH para RT-qPCR, todos ellos específicos de ratón. Todos los cebadores fueron diseñados usando la base de datos *Primer database NCBI*.

3.7.- Estudios de migración *in vitro*

3.7.1.- Sistema Transwell®

Para los estudios de migración *in vitro* se utiliza el sistema Transwell®. Este sistema posibilita el cocultivo de dos tipos celulares separados por una membrana semipermeable. En el compartimento superior se sitúan las neuroesferas disgregadas en pase 2 ó 3 y, en el compartimento inferior, un cultivo primario de astrocitos o medio que ha estado en contacto con astrocitos durante 48 horas (Figura 3.6). A este último le denominaremos *medio condicionado de astrocitos*.

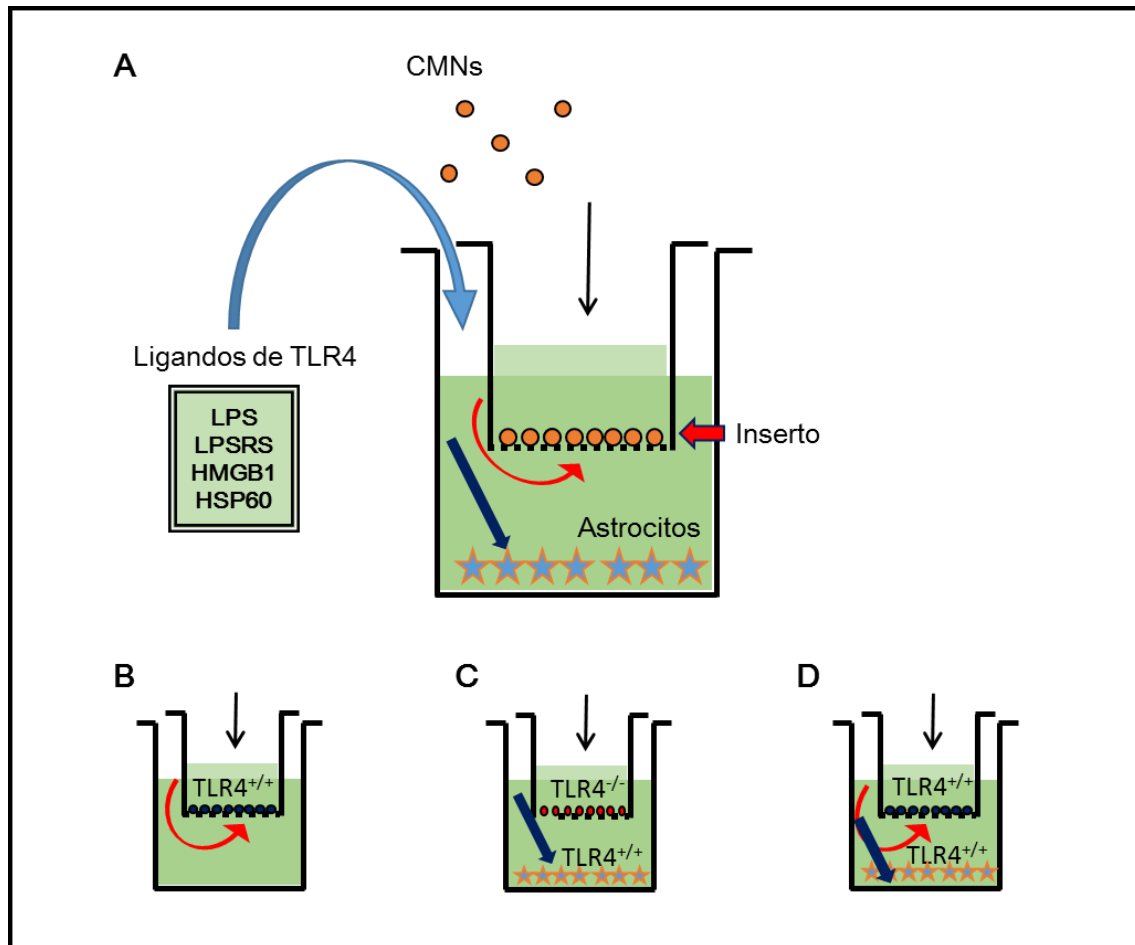


Figura 3.6. Esquema representativo de los ensayos de migración en el sistema Transwell®. (A) La disposición de los distintos elementos se detalla en la imagen. (B) Los ensayos de migración realizados se clasifican en tres tipos: efecto de la activación del TLR4 de las CMNs, (C) efecto de la activación del TLR4 de los astrocitos y (D) efecto conjunto de la activación del TLR4 de ambos tipos celulares.

Los distintos ligandos de TLR4 recogidos en la **Tabla 4** se añadieron al medio que está en contacto con ambos cultivos celulares y a las concentraciones finales indicadas. En la presente tesis se utilizaron insertos Transwell® de 6,5 mm de diámetro y 8 μm de tamaño de poro (Costar). Los insertos se trataron previamente a ser utilizados con poli-L-Lisina a 100 $\mu\text{g/mL}$ durante una noche a 4°C o 2 horas a 37°C y, posteriormente, tras varios lavados con agua, se incubaron con laminina a 15 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich) durante 2 h a 37°C. Tras 2-3 lavados adicionales con agua, los insertos se dejaron secando a 37°C hasta ser utilizados.

Las condiciones estandarizadas que se usaron para los experimentos fueron de 40.000 CMN en el compartimento superior y astrocitos con una confluencia del 80-100% en el compartimento inferior. El sistema se mantuvo durante 48 horas a 37°C y 5% CO_2 .

Inmunocitoquímica con Tuj-1 y TOPRO-3

Los insertos se extrajeron de su correspondiente soporte, tras lo cual las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 min. Una vez fijadas y lavadas con PBS para eliminar los restos de PFA se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0,3% y se bloquearon las uniones inespecíficas utilizando suero al 10% de la especie en la que se hizo el anticuerpo secundario (*donkey*).

Seguidamente se incubaron los insertos con el anticuerpo primario anti-Tuj-1 hecho en ratón (1:100; Millipore) diluido en solución de bloqueo durante 15-18 h a 4°C y, a continuación, con el anticuerpo secundario *donkey* anti-*mouse* Cy3 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) durante 2 h.

Tras varios lavados se incubaron los insertos con TOPRO-3 (Invitrogen) como marcador nuclear durante 5 min a una concentración de 1:5000 en PBS, se volvieron a lavar y finalmente se montaron los insertos con medio de montaje para fluorescencia *Aqua Poly/Mount* (Figura 3.7).

Se realizaron controles en paralelo sin anticuerpo primario para verificar que la fluorescencia observada no se debía a uniones inespecíficas.

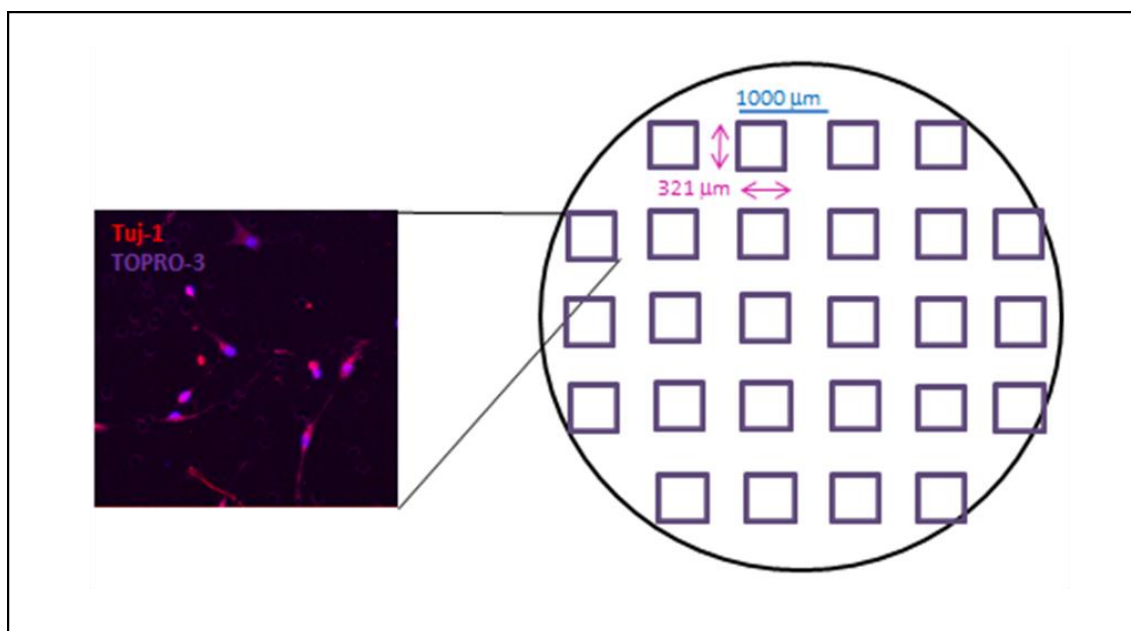


Figura 3.7. Representación esquemática de la cuantificación de neuroblastos migrados en el sistema Transwell®. Se toman fotos con un microscopio confocal a 20X espaciando las fotos 1000 µm para rastrear toda la superficie del inserto. Fueron analizadas una media de 25 imágenes por inserto.

Cuantificación celular

La cuantificación de neuroblastos migrados se realizó mediante microscopía confocal utilizando el software de análisis ZEN 2008.

Todo el área del inserto fue mapeada tomando imágenes cada 1000 μm a un aumento de 20X (321x321 μm), obteniendo aproximadamente 25 imágenes. Se contaron manualmente el número de células Tuj-1/TOPRO-3 positivas para cada una de las imágenes estableciendo el número medio de neuroblastos migrados por campo (Figura 3.7).

3.7.2.- Análisis de expresión de mediadores neurogénicos

Tratamiento de astrocitos con ligandos de TLR4

Los astrocitos de ratón obtenidos de cultivo primario se incubaron en placas *Petri* P100 y se dejaron proliferar hasta obtener aproximadamente un 80% de confluencia. En ese punto se añadió dibutiril AMP cíclico a 500 μM (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 6-9 días para activar a los astrocitos adquiriendo así una morfología similar a los astrocitos presentes en la corteza cerebral. Transcurrido este tiempo, se añadió al medio de astrocitos los ligandos del receptor TLR4: LPS, LPSRS y HMGB1, todos ellos a 100 ng/mL. Los astrocitos se aislaron para cada condición a distintos tiempos: 3, 6, 24 o 48 horas.

Extracción de ARN de astrocitos y análisis de la expresión de ARNm por RT-qPCR

La extracción de ARN de los astrocitos se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.6.2, eliminando la etapa de disgregación con jeringas de 25G. El análisis de expresión de moléculas implicadas en migración por RT-qPCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.6.3.

3.8.- Estudio de diferenciación *in vivo*

Contaje de células BrdU⁺/NeuN⁺ en corteza ipsilesional mediante microscopía confocal

Como método de estudio de las nuevas neuronas generadas en la corteza ipsilesional tras la isquemia se realizó una cuantificación de las células marcadas con bromodeoxiuridina (BrdU) (1:100; ABD Serotec, Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, USA), un análogo de timidina que se incorpora al ADN en células en división, y NeuN (1:200 MAB 377; Millipore, Billerica, MA, USA), un antígeno nuclear neuronal.

Las células se cuantificaron en 5 secciones equidistantes separadas 320 μm partiendo de 1,7 mm a 0,1 mm de bregma para el análisis de la diferenciación neuronal en la corteza rostral, y desde bregma a $-1,6$ mm para el análisis de la diferenciación neuronal en la corteza caudal. De cada una de las secciones se tomaron imágenes a 40X y separadas entre sí 400 μm hasta que rastreamos toda la parte superior de la corteza y 800 μm por debajo del infarto, utilizando como límites el cuerpo calloso y el final de la corteza. Se analizó un total de unas 18-20 imágenes por hemisferio y sección (Figura 3.8).

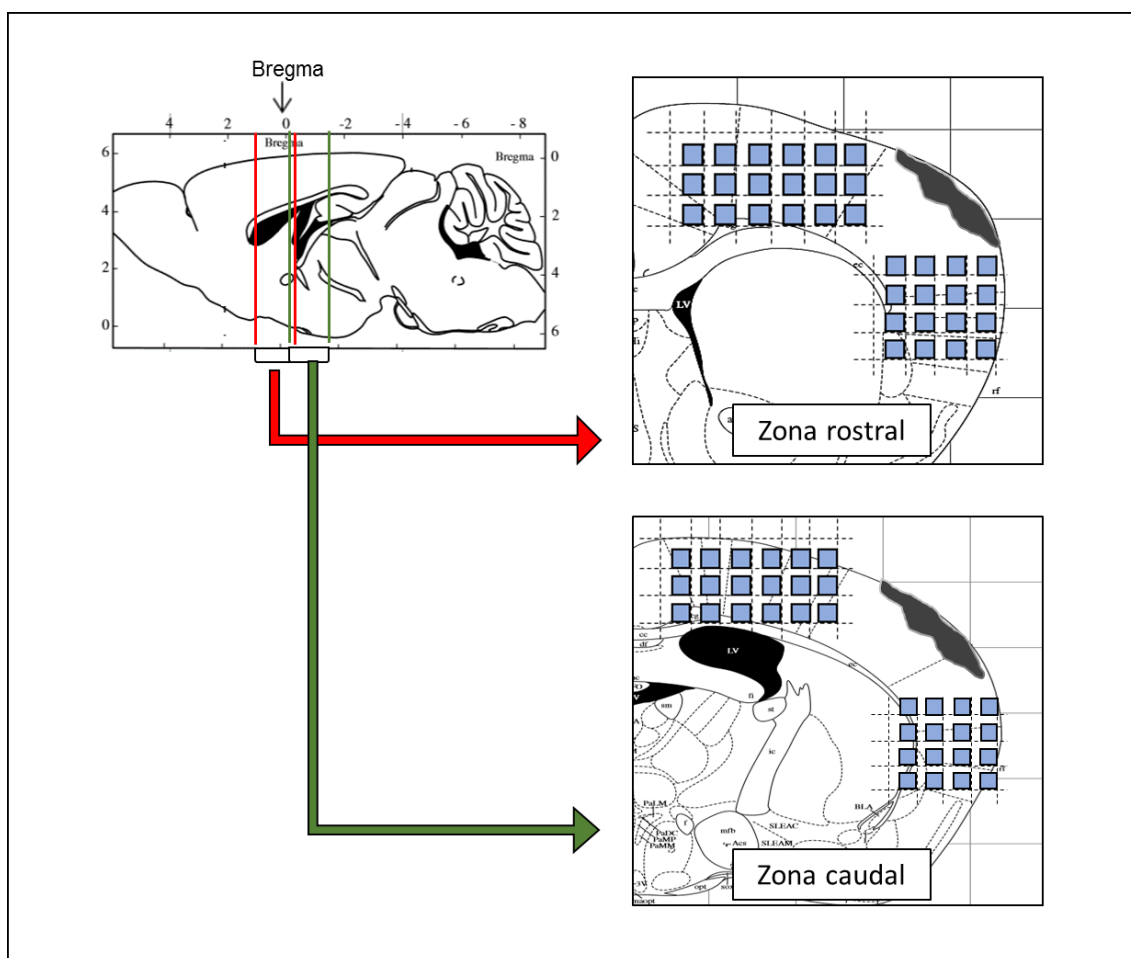


Figura 3.8. Esquema representativo de las zonas analizadas para el estudio de diferenciación neuronal en la corteza ipsilesional. Se cuantificaron 5 secciones equidistantes (de 1,7 mm a 0,1 mm de bregma para el análisis de la corteza rostral, y 0 mm a $-1,6$ mm, para el análisis de la corteza caudal) tomando 18-20 imágenes por corteza y sección.

Para verificar las colocalizaciones se estudió la proyección ortogonal de cada imagen y sus dos marcajes, tomando únicamente como colocalización positiva aquella

en la cual ambos marcajes dan señal en los mismos vóxeles. El software empleado para la toma y análisis de imágenes fue ZEN 2008.

Para el análisis del destino celular hacia neuronas o *cell fate* neuronal de las células que proliferan en la ZSV se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de neuronas} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ Células BrdU}^+/\text{NeuN}^+ \text{ en corteza peri-infarto}}{\text{N}^{\circ} \text{ Células BrdU}^+ \text{ en corteza peri-infarto}} \times 100$$

3.9.- Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software Prism 6 para Windows (GraphPad Software, Inc.). Para el análisis estadístico se ha realizado el *t* de *Student* con post-test Mann-Whitney para comparar dos grupos experimentales no paramétricos o el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías (dependiendo del número de variables) seguido de un test de comparación de Bonferroni, para comparación de dos o más grupos. Todos los resultados se expresan como la media de diferentes experimentos independientes \pm el error estándar de la media (EEM) y se consideró el valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- RESULTADOS BLOQUE I: Perfil temporal de la neurogénesis cortical tras una isquemia cerebral experimental

4.1.1.- Diseño experimental y tamaño de infarto

Con el objetivo de evaluar el perfil temporal de las distintas etapas de la neurogénesis (proliferación, migración y diferenciación neuronal) tras un ictus isquémico, se diseñó el siguiente protocolo: ratones C57BL/6 jóvenes se sometieron a una isquemia experimental cortical y se sacrificaron a distintos tiempos tras la cirugía, 1, 2, 7, 14, 28 y 65 días. Todos los animales fueron sometidos a inyecciones intraperitoneales de BrdU (50 mg/kg), lo que permitirá estudiar la diferenciación neuronal siguiendo dos protocolos descritos más adelante (**Figura 4.1A**).

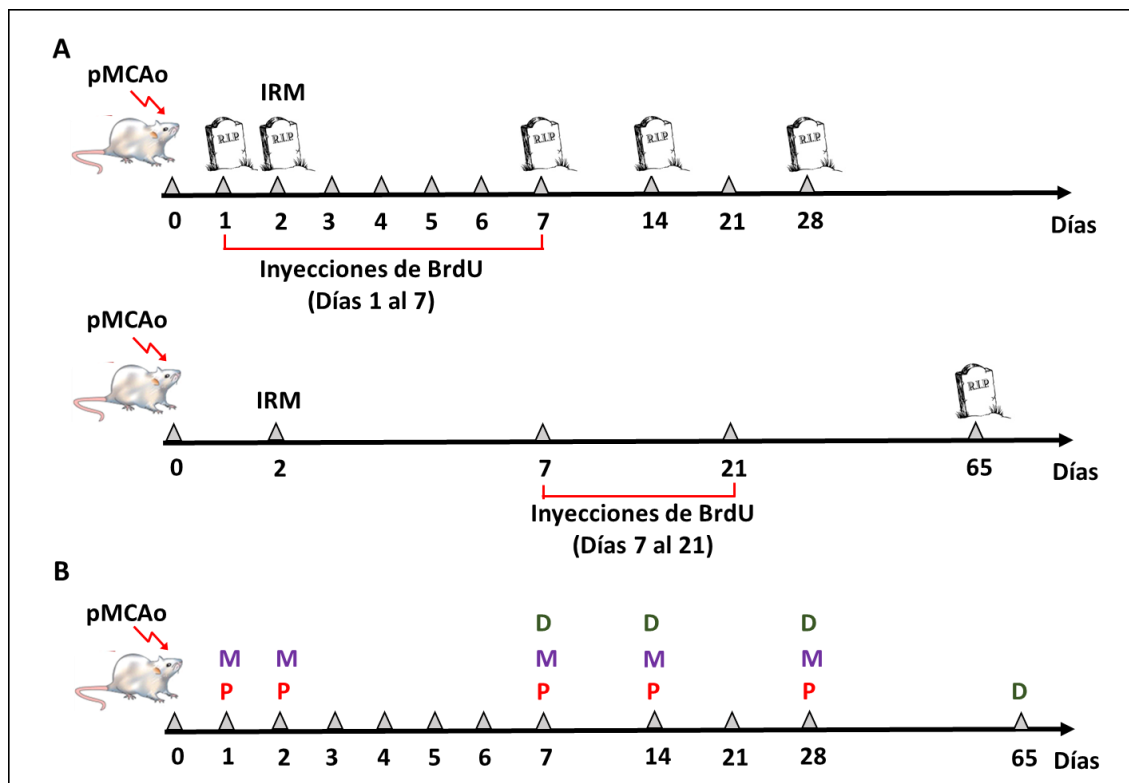


Figura 4.1. Protocolo experimental para el estudio del perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV. (A) Se realizaron dos protocolos experimentales de inyecciones de BrdU con el fin de realizar un seguimiento de las células que estaban proliferando en el momento de cada inyección. Para estudiar el destino de las células que proliferan durante la primera semana tras la isquemia, se empleó el protocolo de inyecciones del día 1 a 7 tras la misma, estudiando la diferenciación neuronal a los 7, 14 y 28 días en la corteza ipsilesional. El seguimiento de las células que

proliferan durante la segunda y tercera semana tras el daño cerebral se estudió a los 65 días tras el mismo. Los días de sacrificio, así como el momento de análisis del infarto por IRM, se muestran en la figura. (B) Esquema de los días a los cuales se realizaron los estudios de proliferación (P), migración (M) y diferenciación neuronal (D).

El análisis de la proliferación en la ZSV se realizó los días 1, 2, 7, 14, y 28. Por otro lado, el estudio de la migración de neuroblastos, dividido en dos análisis distintos, véase, migración hacia el bulbo olfatorio y migración ectópica en la zona rostral y en la zona caudal, se llevó a cabo los días 1, 2, 7, 14 y 28 tras la inducción del daño cerebral. Por último, la diferenciación neuronal en la corteza ipsilateral se analizó los días 7, 14, 28 y 65 tras la isquemia experimental (Figura 4.1B).

El porcentaje medio de hemisferio infartado de los animales a las 48 horas de la isquemia experimental (excepto en los animales sacrificados a las 24 horas en los que la IRM se realizó a las 21 horas) fue de $13,6 \pm 0,64\%$ ($n=58$). Como se ha explicado previamente, el número de células en proliferación en la ZSV es dependiente del volumen de infarto (Moraga et al., 2014), por lo que analizamos por separado el porcentaje de hemisferio infartado en los tiempos estudiados, evitando así ese sesgo en el caso de observar cambios en la proliferación en la ZSV. Todos los volúmenes de infarto eran comparables, no existiendo diferencias significativas entre grupos (Figura 4.2).

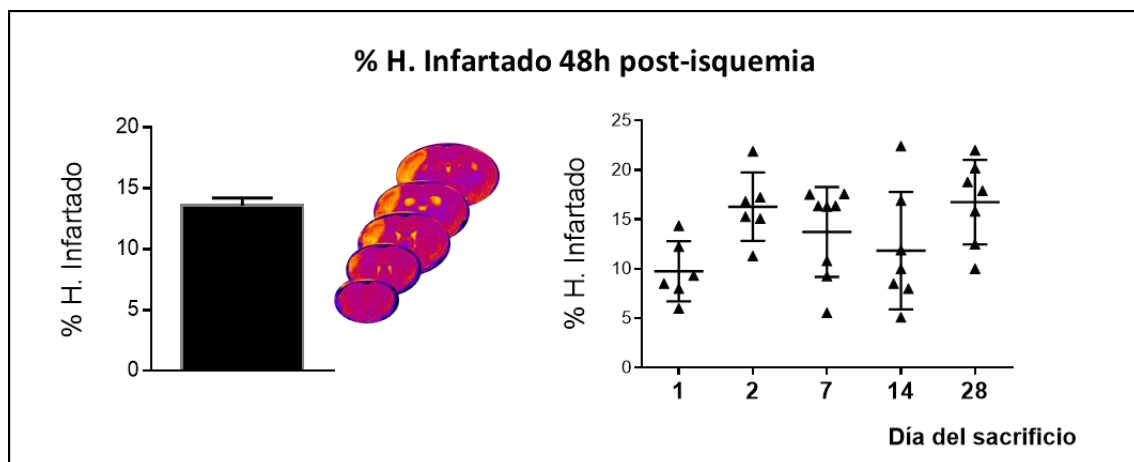


Figura 4.2. Porcentaje de hemisferio infartado 48 horas tras la isquemia experimental. El infarto se cuantificó mediante IRM a las 21 horas (para el grupo de animales sacrificados a 24 horas) o a las 48 horas (para el resto de grupos). El valor medio del porcentaje de hemisferio infartado fue representado como media \pm EEM. No hay diferencias significativas al realizar ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni ($p > 0,05$, $n=6-8$).

4.1.2.- Perfil temporal de la proliferación en la ZSV

Con el fin de analizar el efecto de la isquemia sobre el número de células que se encuentran proliferando en la ZSV, se cuantificó, a los tiempos seleccionados (1, 2, 7, 14 y 28 días), el número estimado de células pHIS3⁺ presentes en la extensión dorsolateral de la ZSV, tanto ipsilesional como contralesional (**Figura 4.3**), así como el volumen de ambas ZSV (**Figura 4.4**).

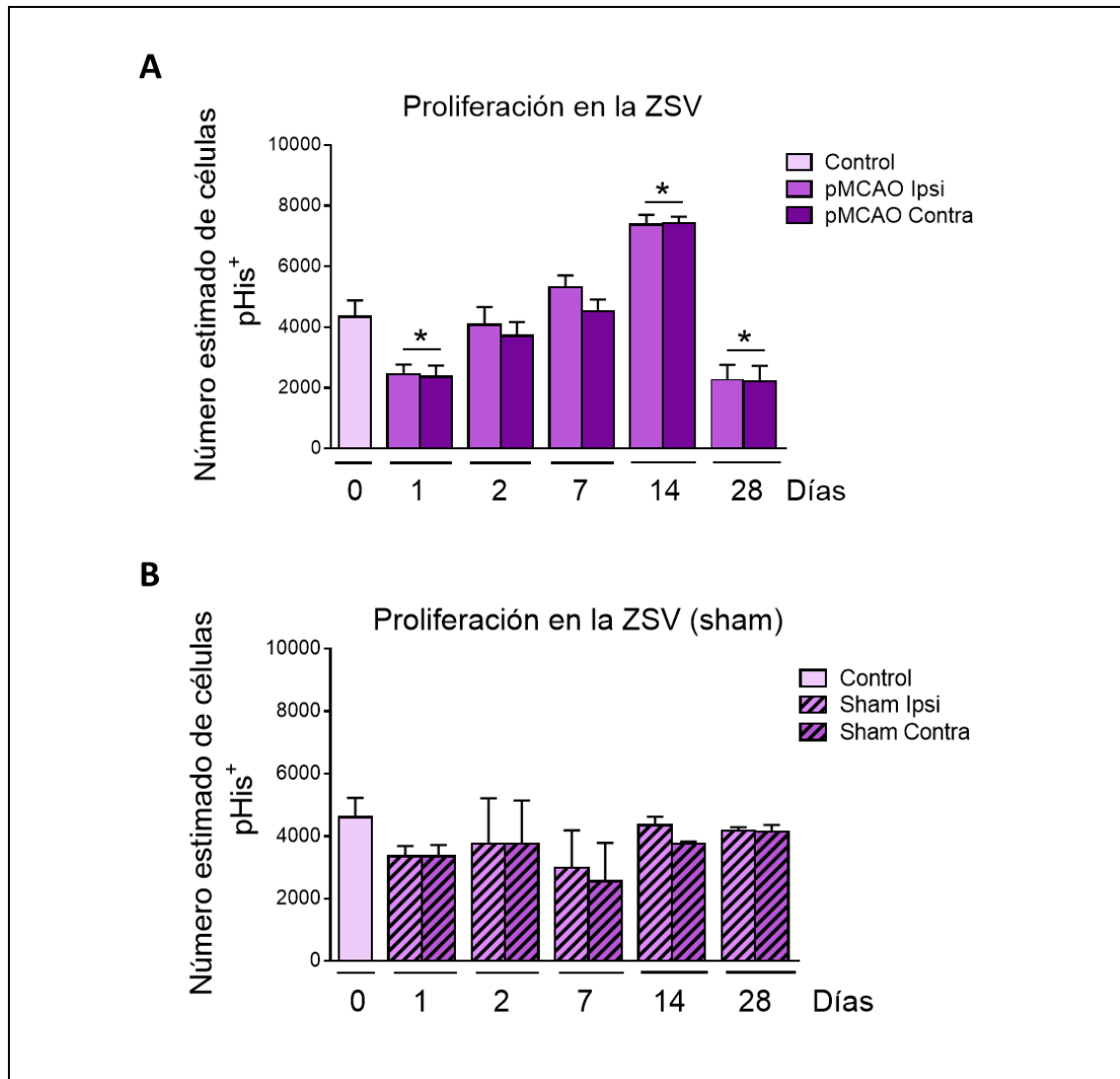


Figura 4.3. Efecto de la isquemia cerebral en el número de células en proliferación en la ZSV a lo largo del tiempo. (A) Las células mitóticas se cuantificaron mediante tinción de inmunofluorescencia con pHIS3. (B) El volumen estimado de la ZSV fue calculado mediante la técnica de estimación por Cavalieri. Los datos se representan como medias \pm EEM (* $p < 0.05$ vs. control, ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni; $n = 6-8$).

El análisis de la proliferación en la ZSV dio como resultado, comparado con el animal no isquémico (tanto el control como su correspondiente *sham*), una disminución del número de células proliferativas a las 24 horas de la isquemia experimental (**Figura 4.3A**, $p<0.05$ vs. control). Los niveles se reestablecen a continuación a los 2 y 7 días, recuperando los valores basales. Seguidamente, se observó un incremento significativo, a los 14 días de la isquemia, del número de células pHis3⁺. Finalmente, a los 28 días, se observa una disminución, de nuevo significativa, similar a la encontrada a las 24 horas. Cabe destacar que, en todos los días estudiados, el número de células proliferando es similar en ambas ZSV, tanto en la ipsilateral como en la contralateral, lo que indica que los cambios en la proliferación celular inducidos por una isquemia son bilaterales y permanece así al menos hasta los 28 días del daño cerebral (**Figura 4.3A**). Además, los cambios observados se deben a la isquemia, no a la cirugía, ya que los animales *sham* no muestran los citados cambios a lo largo del tiempo (**Figura 4.3B**).

El tamaño del fraccionador óptico optimizado para el conteo, el número de sitios de conteo muestreados, así como los datos obtenidos en la estereología son recogidos en la **Tabla 7**.

		Control	1 d	2 d	7 d	14 d	28 d
Área del marco de conteo (μm^2)		450 (30x15)					
Sitios de conteo por cerebro		596 \pm 13	510 \pm 30	546 \pm 32	569 \pm 32	589 \pm 31	563 \pm 32
Total de células pHis3 ⁺	Ipsi Contra	101 \pm 12	56 \pm 7 (*) 56 \pm 8 (*)	105 \pm 17 84 \pm 10	116 \pm 9 99 \pm 10	178 \pm 15(*) 179 \pm 10 (*)	67 \pm 13 (*) 63 \pm 17 (*)
CE, Gundersen, m=0	Ipsi Contra	0,17 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02 0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01 0,17 \pm 0,03	0,14 \pm 0,005 0,15 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02 0,13 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02 0,22 \pm 0,05

Tabla 7. Descripción de los parámetros obtenidos en la cuantificación estereológica de células pHis3⁺. Los datos se representan como medias \pm EEM (* $p<0.05$ vs. control, n=6-8).

El análisis del volumen de las ZSVs dio como resultado ausencia de cambios, tanto a lo largo del tiempo como comparando la ZSV de ambos hemisferios, ipsilateral y contralateral (**Figura 4.4**).

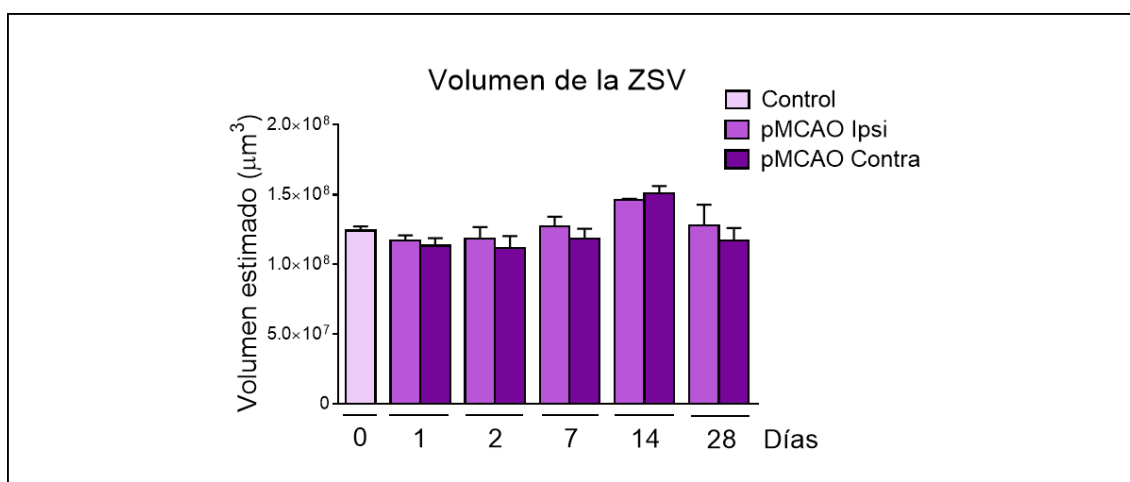


Figura 4.4. Efecto de la isquemia cerebral en el volumen de la ZSV a lo largo del tiempo. El volumen de la ZSV fue calculado mediante la técnica de estimación por Cavalieri. Los datos se representan como medias \pm EEM (n=6-8).

4.1.2.1.- Medida de pH en plasma y LCR y análisis de la composición del LCR en fase aguda de la isquemia

El análisis de pH en las muestras de plasma en situación control y a diferentes tiempos tras isquemia experimental, reveló una disminución del pH a las 24 horas, retornando a los niveles basales a las 48 horas del insulto isquémico (**Figura 4.5A**).

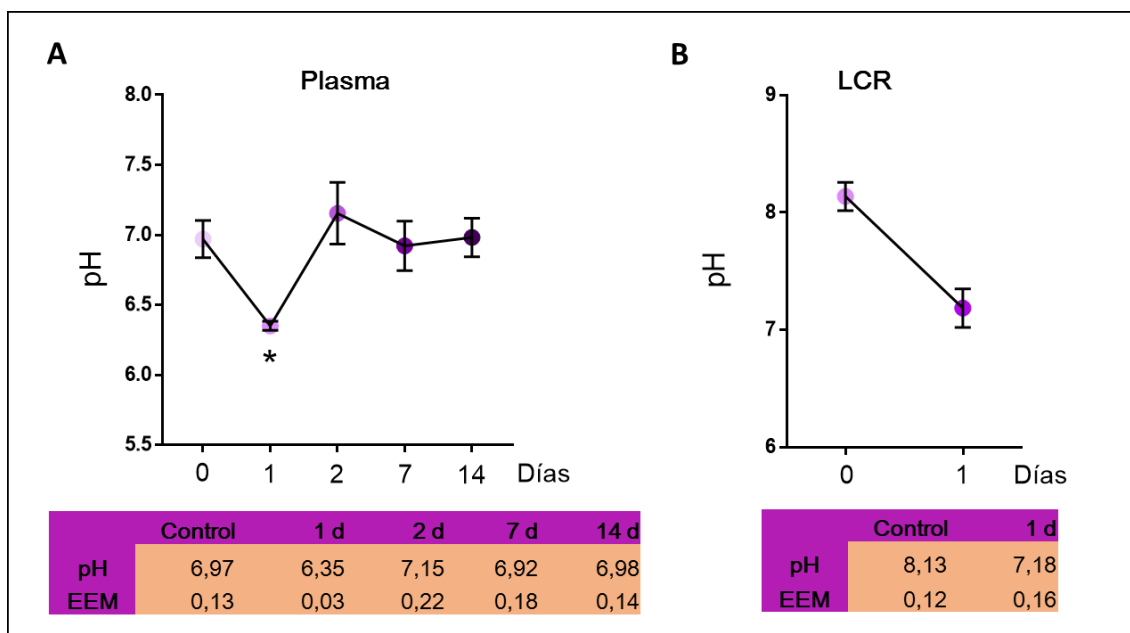


Figura 4.5. Medidas de pH en plasma y LCR tras una isquemia cortical experimental. (A) Valores de pH en plasma medido en condiciones basales y a 1, 2, 7 y 14 días después de la isquemia experimental. (B) Valores de pH en LCR medido en condiciones basales y a 1 día después de isquemia (n=6-12 muestras de plasma; n=2 muestras LCR, estudio preliminar). Los datos se representan como medias \pm EEM (*p<0.05 vs. control).

El análisis del pH en el LCR mostró de nuevo una acidificación a las 24 horas comparado con el pH basal (n=2-3, resultados preliminares) (**Figura 4.5B**).

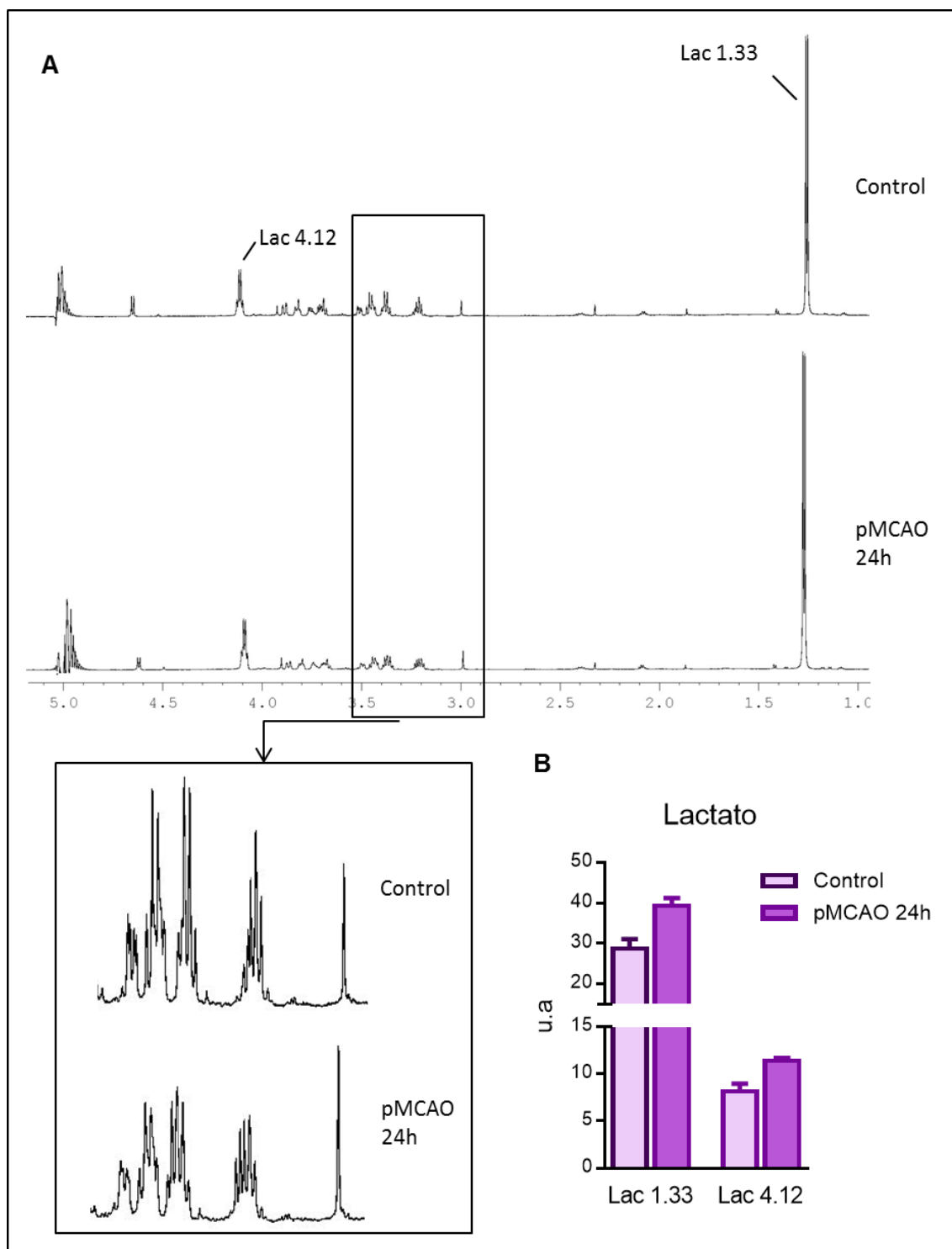


Figura 4.6. Espectros de RMN-Metabolómica del LCR. (A) Se realizó el espectro de animales control e isquémicos de 24 horas. (B) El área bajo la curva de los picos correspondientes a la molécula de lactato fue cuantificado mediante integración de la misma (n=2, estudio preliminar).

Coincidiendo con esta disminución de pH, el espectro de metabolómica realizado mediante RMN (**Figura 4.6A**) mostró, en un estudio preliminar (n=2), un incremento de la concentración de lactato en el LCR a este tiempo tras isquemia experimental (**Figura 4.6B**).

4.1.3.- Perfil temporal de la migración eutópica de neuroblastos

Debido a que la ruta predefinida que siguen los neuroblastos generados en la ZSV es la RMR, se llevó a cabo una cuantificación mediante densitometría de los neuroblastos que se encontraban migrando en dicha ruta (**Figura 4.7A**) a los distintos tiempos estudiados tras la inducción de la isquemia cerebral.

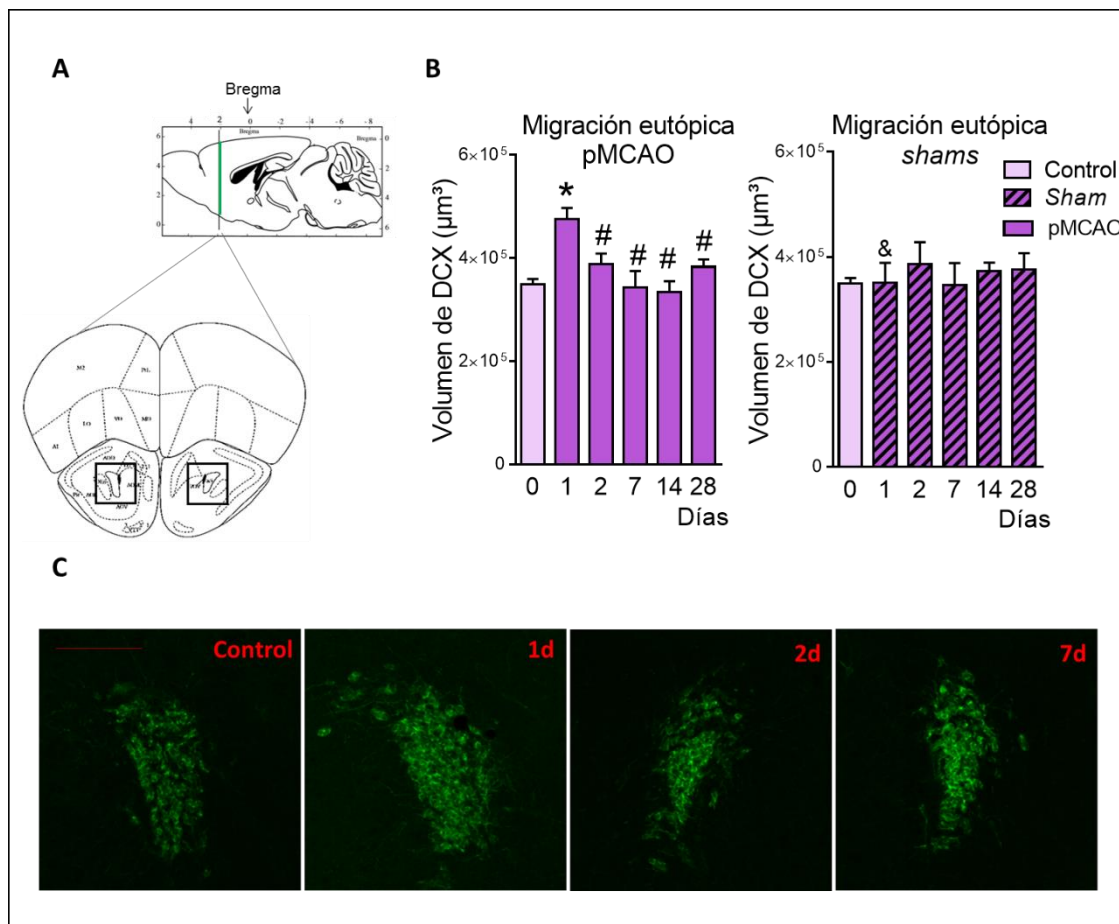


Figura 4.7. Efecto de la isquemia en la migración eutópica de los neuroblastos desde la ZSV al BO a través de la RMR. (A) Se establecieron como campos de análisis los correspondientes a la RMR de dos cortes consecutivos separados 320 μm y (B) se representó el volumen que ocupaban las células DCX⁺ obtenido por densitometría de las imágenes tomadas por microscopía confocal. (C) Se muestran imágenes representativas seleccionadas de un animal control e isquémicos sacrificados el día 1, 2 y 7 tras la cirugía. Los datos se representan como medias ±

EEM (* $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. tiempo anterior, & $p < 0.05$ vs. pMCAO, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni; $n = 6$ pMCAO, $n = 3$ *sham*).

Se observa un incremento del volumen ocupado por los neuroblastos presentes en la RMR a las 24 horas de la isquemia, tanto comparado con los animales control como con su correspondiente *sham*. El volumen de neuroblastos vuelve a su nivel basal a los 2 días y permanece constante hasta, al menos, 28 días tras la oclusión de la arteria (**Figura 4.7B**, $p < 0.05$ vs. control). Los animales *sham* no variaron su migración eutópica rostral a los tiempos analizados. En la **figura 4.7C** se muestra una recopilación de imágenes representativas de los cambios en la migración citados anteriormente.

4.1.4.- Perfil temporal de la migración de neuroblastos hacia el área isquémica

Con el fin de analizar la cantidad de neuroblastos que cambian su migración predefinida en presencia de un daño isquémico cortical, es decir, la migración ectópica, y teniendo en cuenta que los infartos obtenidos con el modelo de ligadura cubren en el eje rostro-caudal aproximadamente desde -2,5 a 2,5 mm de bregma, analizamos la migración de los neuroblastos hacia la lesión en dos áreas distintas: la zona “rostral” de 1,70 y 0,1 mm de bregma, y la zona “caudal”, comenzando en bregma y finalizando a -0,96 mm.

4.1.4.1.- Migración ectópica de neuroblastos a través de la zona rostral

Para el análisis de los neuroblastos presentes en el área rostral se analizaron 3 zonas migratorias: **Z1**, correspondiente a la ZSV, **Z2**, zona delimitada por el cuerpo calloso, y **Z3**, área limitada con la zona infartada (**Figura 4.8A**). El volumen de neuroblastos, en cada una de las zonas y para cada tiempo, fue cuantificado tanto en el hemisferio ipsilateral como contralateral para verificar si se trataba de un proceso unilateral o bilateral.

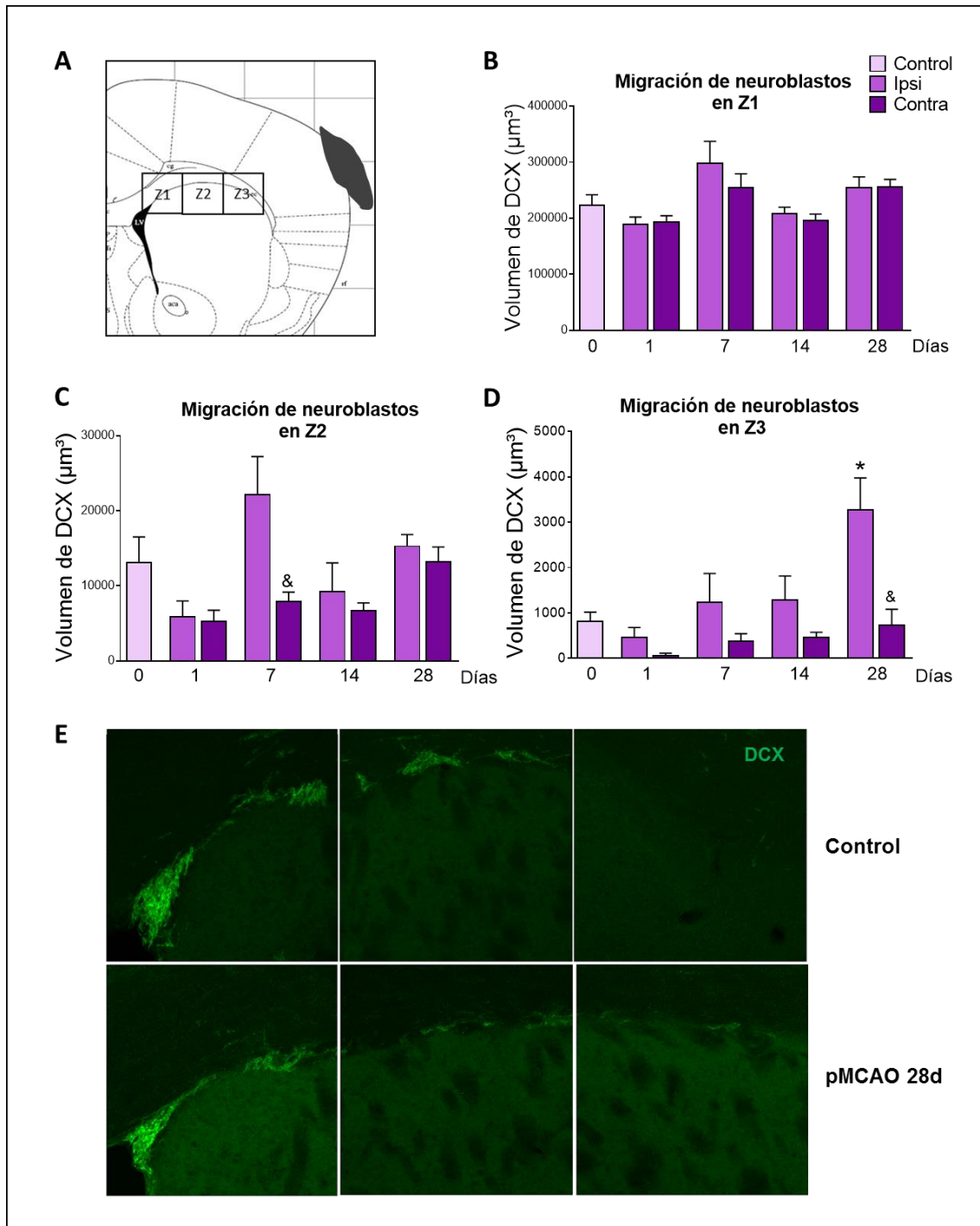


Figura 4.8. Efecto de la isquemia experimental en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona rostral. (A) Las zonas migratorias establecidas corresponden con la ZSV (Z1), el cuerpo calloso (Z2) y el periinfarto (Z3). El volumen de células DCX⁺ para cada zona se encuentra representado en los paneles: **B**, para Z1; **C**, para Z2; y **D**, para Z3. (E) Imágenes representativas de las 3 zonas analizadas para un animal control y un isquémico sacrificado a los 28 días. Los datos son representados como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ vs. control, & $p < 0.05$ ipsi vs. contra; ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni (pMCAO-control, ipsi-contra); $n=6$).

La comparación del volumen de neuroblastos que se encontraban migrando en Z1 a los distintos tiempos analizados no daba lugar a diferencias, ni a lo largo del tiempo ni en función del hemisferio estudiado (**Figura 4.8B**). El análisis de Z2, por otro lado, aunque no presentaba diferencias respecto al grupo control, sí que mostraba un efecto bilateral a los 7 días tras la inducción de la isquemia, siendo la migración en esta zona significativamente mayor en el hemisferio ipsilateral comparado con el contralateral (**Figura 4.8C**, $&p<0.05$ vs. ipsilateral). Finalmente, el análisis de los neuroblastos presentes en Z3 mostró un incremento significativo a los 28 días del daño isquémico en el hemisferio ipsilateral, tanto respecto a su contralateral como al animal control (**Figura 4.8D**, $*p<0.05$ vs. control, $&p<0.05$ vs. ipsilateral). Imágenes representativas para cada una de las zonas en un animal control y un animal isquémico de 28 días se muestran en la **Figura 4.8E**.

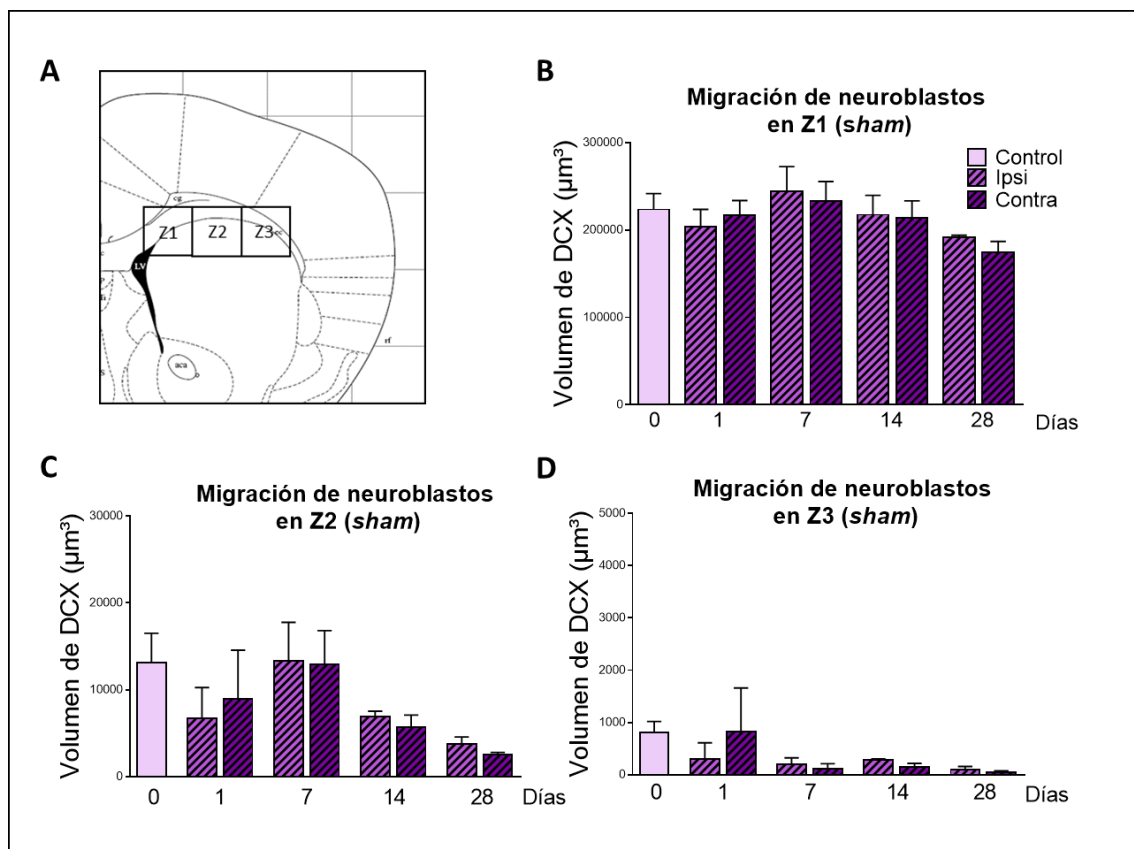


Figura 4.9. Efecto de la cirugía (animales *sham*) en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona rostral. (A) Las zonas migratorias establecidas corresponden con la ZSV (Z1), el cuerpo calloso (Z2) y el periinfarto (Z3). El volumen de células DCX⁺ para cada zona se encuentra representado en los paneles: B, para Z1; C, para Z2; y D, para Z3. Los datos son representados como la media \pm EEM ($n=3$).

La cuantificación de los animales *sham* para cada tiempo analizado se encuentra recogida en la **Figura 4.9**; no hay diferencias significativas en ninguna de las zonas ni tiempos estudiados.

4.1.4.2.- Migración ectópica de neuroblastos a través de la zona caudal

Para el análisis de los neuroblastos presentes en el área caudal, debido a la cercanía de la zona dañada al ventrículo de dicha área, se analizó una única zona, que comprende entre 1 y 3 imágenes (**Figura 4.10A**). El volumen de neuroblastos para cada tiempo fue cuantificado en ambos hemisferios, lo que permitió estudiar la lateralidad del proceso (**Figura 4.10B**).

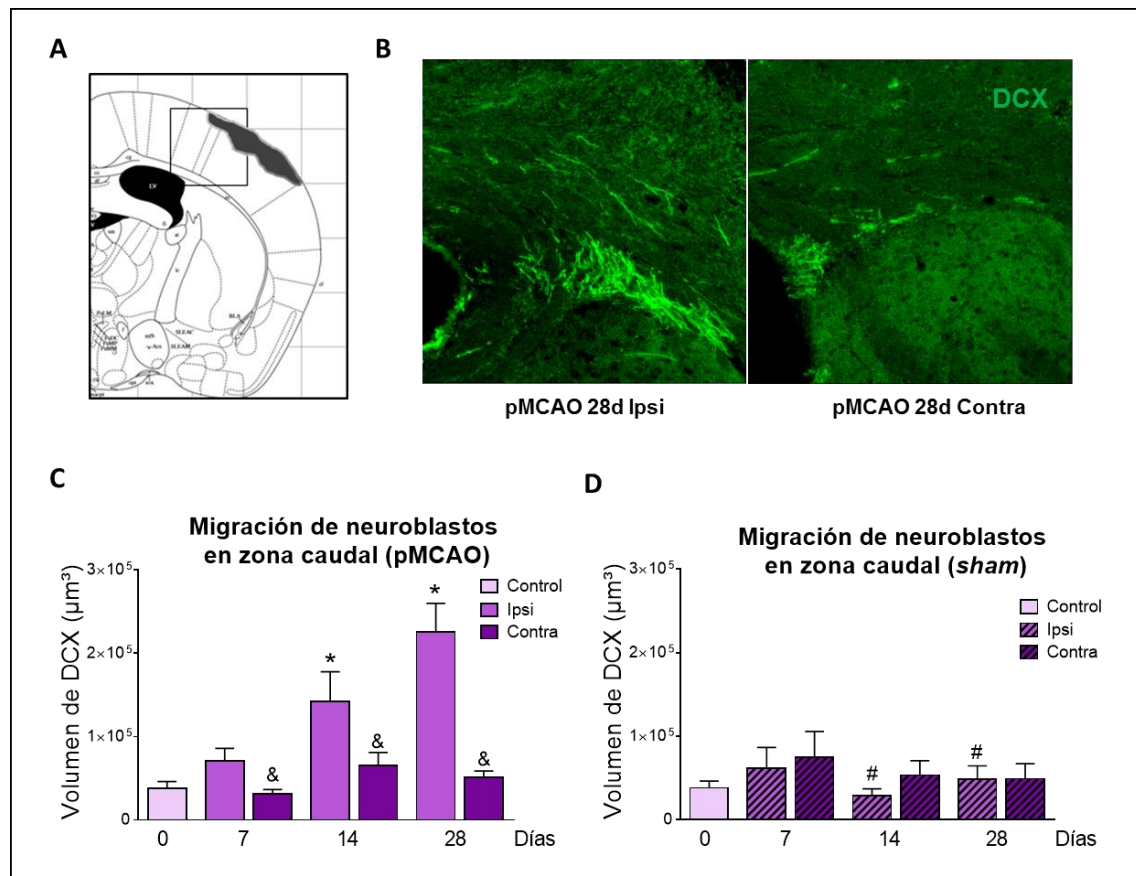


Figura 4.10. Efecto de la isquemia experimental en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona caudal. (A) La zona migratoria establecida corresponde a la representada en el cuadro. (B) Imágenes representativas de la bilateralidad del proceso a los 28 días tras isquemia experimental. (C) El volumen de células DCX⁺ fue analizado para los días 7, 14 y 28 en animales pMCAO y (D) *sham*. Los datos representados son la media \pm EEM (* $p < 0.05$ vs. control, & $p < 0.05$ ipsi vs. contra, # $p < 0.05$ *sham* vs. pMCAO, ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni (pMCAO-*sham*, ipsi-contra); $n = 6$ pMCAO, $n = 3$ *sham*).

Los resultados obtenidos muestran que, a los 3 tiempos analizados, 7, 14 y 28 días, el volumen de neuroblastos es significativamente mayor en el hemisferio ipsilateral que en el contralateral, lo que muestra que la migración ectópica de los progenitores neurales es unilateral a lo largo del tiempo (**Figura 4.10C**, $*p<0.05$ vs. Control, $\&p<0.05$ vs. Ipsilateral). Además, esta migración es también significativamente superior a la observada en los animales control y a la de sus correspondientes *sham* (representados en la **Figura 4.10D**, $\#p<0.05$ *sham* vs. pMCAO) a los 14 y 28 días de la isquemia experimental.

4.1.5.- Estudio de la diferenciación neuronal en la corteza peri-infarto

En base a los resultados obtenidos en los apartados anteriores y con el objeto de analizar la formación de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto, se diseñaron los dos protocolos experimentales explicados previamente. En el primero de ellos (**Protocolo 1**) se procedió a inyectar BrdU durante los 7 primeros días tras la inducción de la isquemia, debido a que en el estudio de proliferación observábamos una recuperación del número de células proliferando en la ZSV al día 2 y 7 respecto a la disminución obtenida a las 24 horas, de tal manera que este protocolo permitirá estudiar el destino de las células que se encontraban proliferando en esa primera semana. El segundo protocolo (**Protocolo 2**) consistió en inyecciones de BrdU desde el día 7 al 21 tras isquemia, en base al pico de proliferación observado a los 14 días tras la isquemia experimental. Debido a que los cambios más significativos en la migración de neuroblastos los habíamos encontrado en la zona caudal, estos animales se sacrificaron a los 65 días de la cirugía y la cuantificación se llevó a cabo en la zona caudal de la corteza.

En la **Figura 4.11** se observa que, siguiendo el **protocolo 1** de inyecciones, el número de células BrdU⁺ en la corteza ipsilesional es significativamente superior 14 días tras isquemia comparado con el animal *sham* (**Figura 4.11B**, $*p<0.05$ vs. *sham*). Además, existe un incremento en el número de células BrdU⁺/NeuN⁺ en la corteza rostral ipsilesional tanto a los 7 como a los 14 días tras la isquemia cerebral (**Figura 4.11C**, $*p<0.05$ vs. *sham*). Sin embargo, esta significación se pierde a los 28 días de la misma.

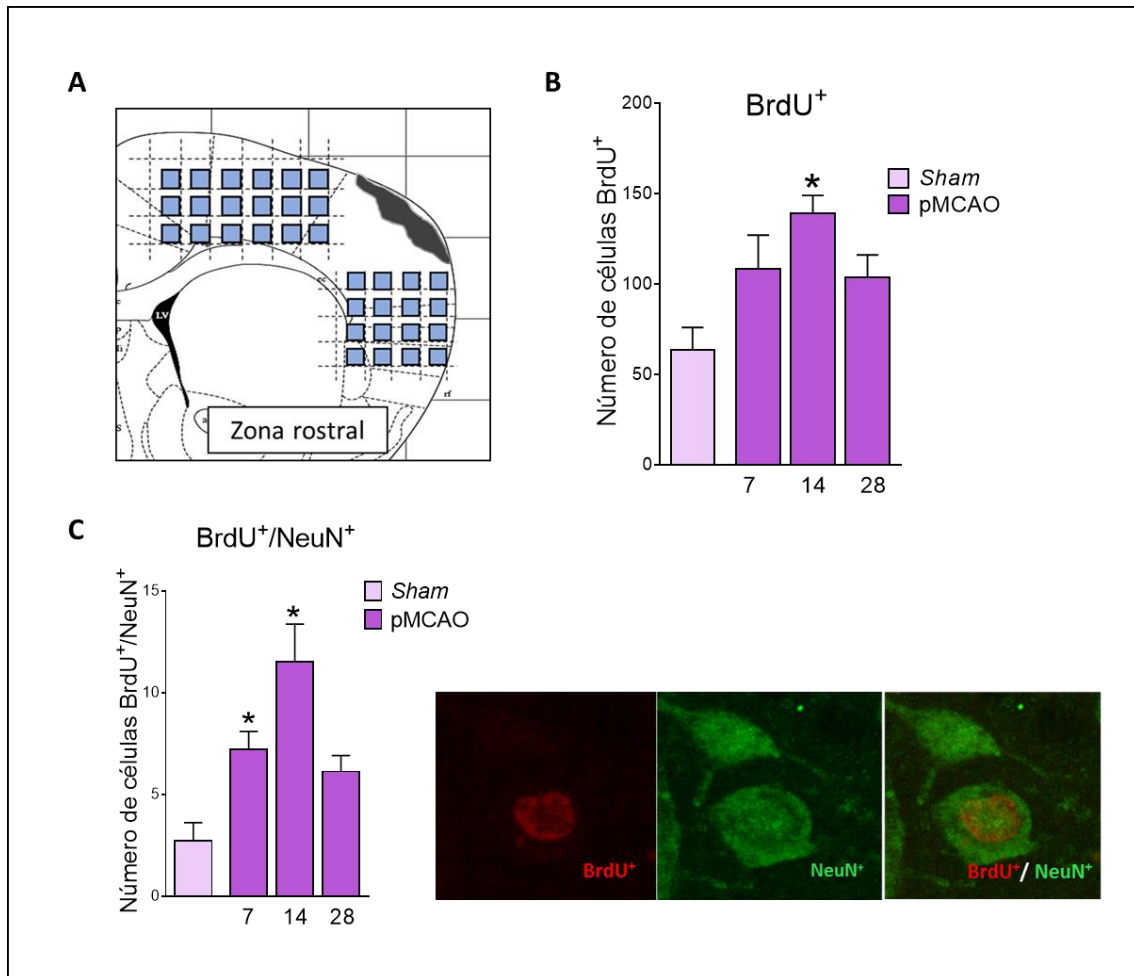


Figura 4.11. Diferenciación neuronal de las células que proliferan durante la primera semana de una isquemia experimental. (A) El análisis del número de nuevas neuronas generadas en la corteza 7, 14 y 28 días tras la isquemia se realizó a partir de 18-20 imágenes de microscopía confocal tomadas en la corteza ipsilesional. (B) Se cuantificó el número de células BrdU⁺ y (C) las colocalizaciones BrdU⁺/NeuN⁺. Todos los resultados fueron representados como la media \pm EEM. (* $p < 0.05$ vs. *sham*, $n = 5-8$).

Por otro lado, cuando analizamos la diferenciación neuronal a los 65 días inyectando BrdU del día 7 al día 21, es decir, realizando un seguimiento de las células que se encontraban en proliferación durante esas dos semanas, observamos un mayor número de células marcadas con BrdU que han llegado a la corteza ipsilesional en el animal con isquemia comparado con su correspondiente *sham* (Figura 4.12B, * $p < 0.05$ vs. *sham*). Además, cuando se analizan las células que expresan, además de BrdU, el marcador neuronal NeuN, se puede observar que el número de nuevas neuronas en corteza es también mayor en el animal isquémico (Figura 4.12C, * $p < 0.05$ vs. *sham*).

A continuación, se calculó el porcentaje de nuevas neuronas en corteza respecto del total de células que habían proliferado entre los días 7 y 14. Como se puede observar en la figura, tanto en el caso del animal *sham* como el isquémico el porcentaje de nuevas células destinadas a neuronas fue del 20% (Figura 4.12D, $*p<0.05$ vs. *sham*).

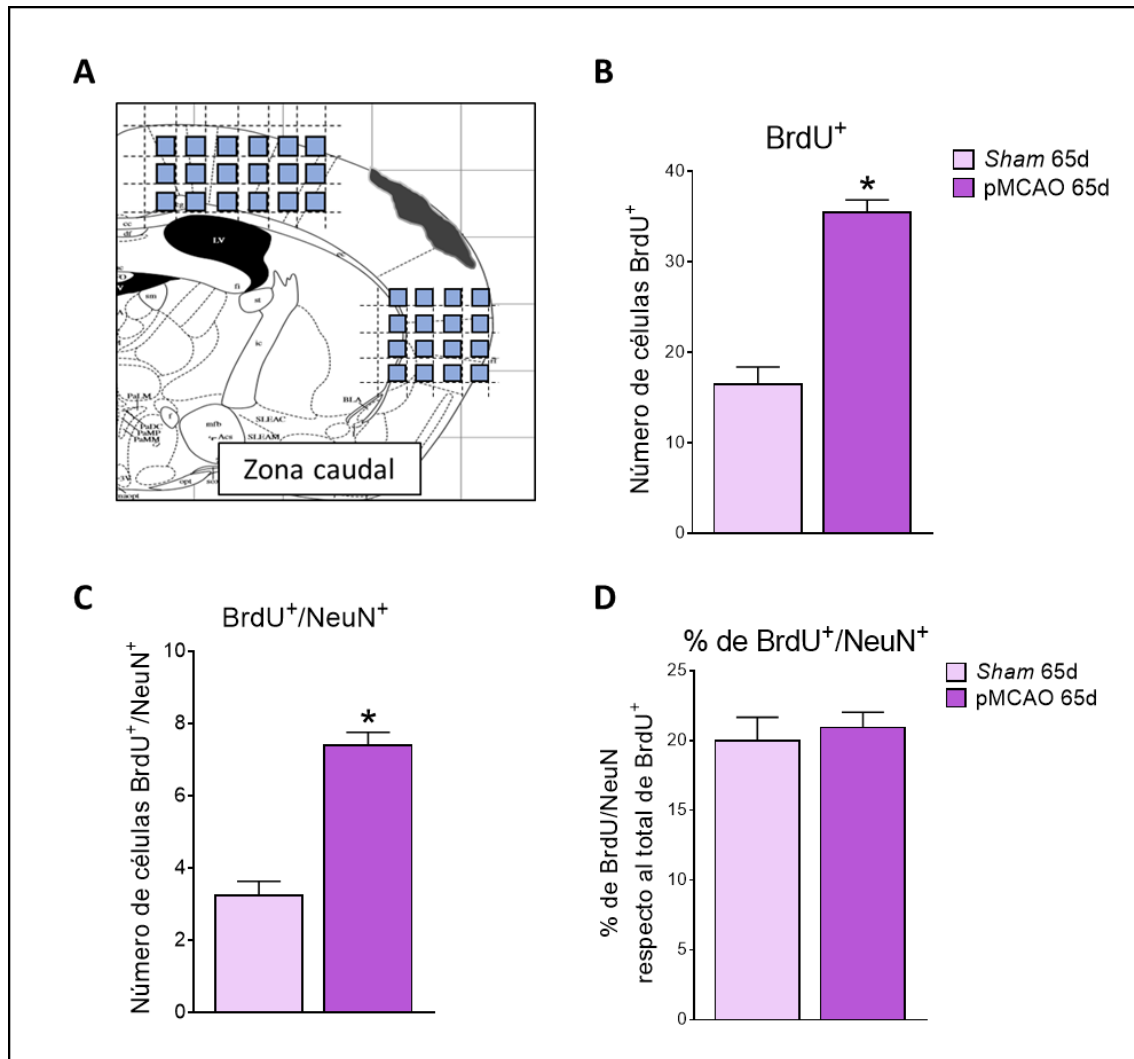


Figura 4.12. Diferenciación neuronal de las células que proliferan durante la segunda y tercera semana de una isquemia experimental. (A) El análisis del número de nuevas neuronas generadas en la corteza 65 días tras la isquemia se realizó a partir de 18-20 imágenes de microscopía confocal tomadas en la corteza ipsilesional. (B) Se cuantificó el número de células BrdU⁺, (C) las colocalizaciones BrdU⁺/NeuN⁺ y, (D) el porcentaje de nuevas neuronas respecto al total de nuevas células (% de BrdU⁺/NeuN⁺ respecto al total de células BrdU⁺). Todos los resultados fueron representados como la media \pm EEM. ($*p<0.05$ vs. *sham*, t-test Mann Whitney, $n=4$).

4.2.- RESULTADOS BLOQUE II: Papel de TLR4 en procesos de neuroreparación en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental

4.2.1.- Efecto de TLR4 en la evolución del infarto cerebral

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron que el número de células en proliferación en la ZSV al tiempo estudiado, de 7 días tras la isquemia, era dependiente del volumen de infarto (Moraga et al., 2014). Por ello, y debido al carácter neuroprotector que supone la deficiencia en TLR4 en fases agudas tras isquemia (Caso et al., 2007), se realizaron los dos grupos experimentales con tamaño de infarto similar ya establecidos en estudios previos (Moraga et al., 2014): oclusión distal en ratones TLR4^{+/+} (la oclusión se realiza en la rama posterior de la ACM) y oclusión proximal en ratones TLR4^{-/-} (la oclusión se realiza debajo de la bifurcación principal de la ACM, en el tronco de la misma), que producen lesiones de igual tamaño. De este modo, eliminamos las posibles diferencias entre grupos debidas a variaciones en el tamaño de infarto, que podrían interferir con las causadas por la presencia o ausencia del receptor, objeto de nuestro estudio. Con el objeto de comparar oclusiones anatómicamente similares, se realizó un grupo complementario de oclusión proximal en animales TLR4^{+/+}.

Para proceder con el estudio temporal del estado proliferativo de la ZSV, se realizó una isquemia cortical permanente a ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con posterior sacrificio a 24 horas, 7 días o 14 días tras la cirugía. Los animales sacrificados a las 24 horas se destinaron, por una parte, a los estudios de las poblaciones de la ZSV por citometría de flujo y, por otra, al análisis de las células en fase activa del ciclo celular mediante inmunohistoquímica con Ki67. Por otro lado, todos los animales sacrificados a 7 y 14 días fueron analizados por inmunohistoquímica (**Figura 4.13A**).

Las medidas del porcentaje de hemisferio infartado mediante IRM confirmaron lo descrito previamente, que la oclusión distal en ratones TLR4^{+/+} y proximal en ratones TLR4^{-/-} produce tamaños de infarto similares a 24 horas y 7 días, mostrando los animales TLR4^{-/-} una mayor pérdida de corteza a los 14 días (**Figura 4.13B**). Por otro lado, el grupo de animales TLR4^{+/+} con oclusión proximal presentó un tamaño de infarto superior al de los grupos anteriormente citados tanto a las 24 horas (**Figura 4.13C**) como a 7 días. Si bien a 14 días las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se

observó una tendencia a una mayor pérdida de corteza en los animales TLR4^{+/+} con oclusión proximal respecto a dicha oclusión en animales TLR4^{-/-} (Figura 4.13D).

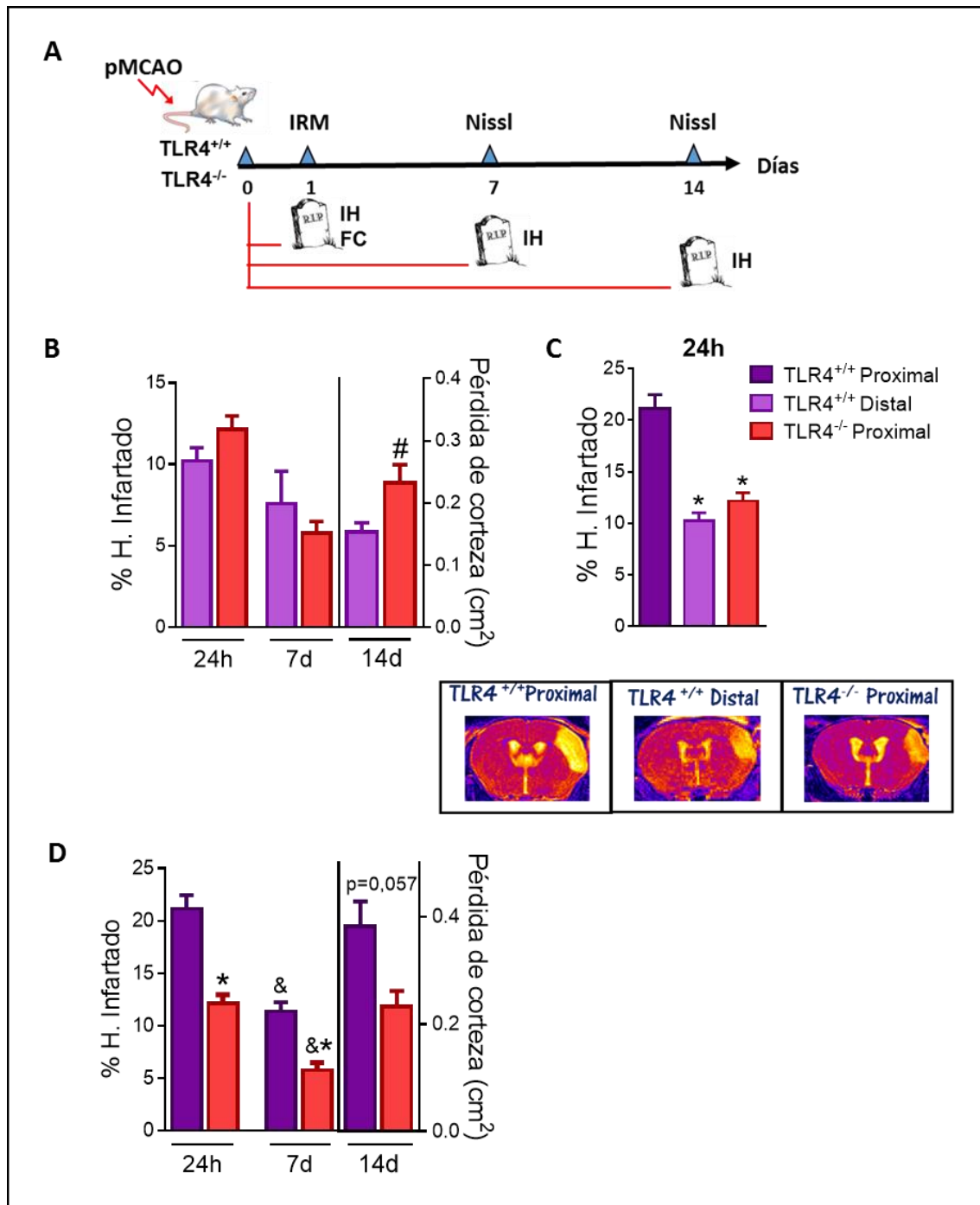


Figura 4.13. Diseño experimental y análisis del infarto cerebral. (A) Animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} fueron sometidos a oclusión distal/proximal y proximal de la ACM, respectivamente, y sacrificados a 1, 7 o 14 días tras la cirugía siendo analizados por IH o FC, dependiendo del grupo experimental. (B) El porcentaje de hemisferio infartado fue cuantificado, en ratones TLR4^{+/+} con oclusión distal y TLR4^{+/+} con oclusión proximal, 24 horas tras la ischemia experimental mediante IRM y por tinción de Nissl a los 7 y 14 días tras la ischemia. (C) La cuantificación del infarto 24

horas tras la isquemia en animales TLR4^{+/+} con oclusión proximal mostró un porcentaje de infarto significativamente superior al de los dos grupos anteriores. (D) El análisis de la evolución del infarto en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con oclusión proximal se analizó de manera análoga a lo descrito en B. IH: Inmunohistoquímica, FC: Citometría de flujo. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=6-8 animales por grupo, * p<0,05 vs. TLR4^{+/+} proximal, & p<0,05 24h vs. 7d, # p<0,05 vs. TLR4^{+/+} distal).

4.2.2.- Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV tras una isquemia cortical

4.2.2.1.- Efecto de TLR4 en el estado proliferativo de la ZSV en condiciones basales y tras isquemia experimental *in vivo*

Para analizar el papel de TLR4 en la proliferación en la ZSV, se realizó un estudio temporal de la expresión de Ki67 utilizando ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con tamaño de infarto similares. Se analizó tanto la zona ipsilesional como contralesional para estudiar si el posible efecto era bilateral o unilateral.

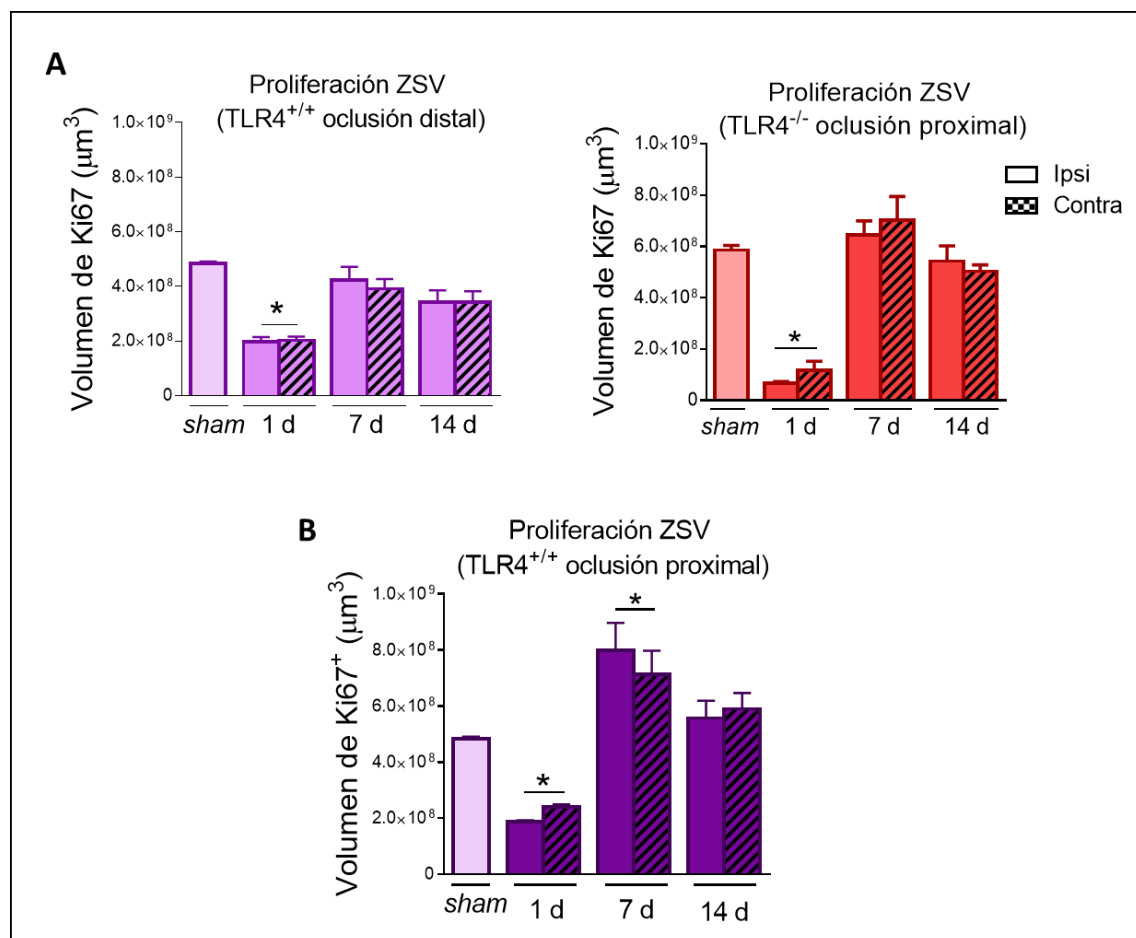


Figura 4.14. Análisis temporal de la proliferación en la ZSV tras isquemia experimental en ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}. Se muestra el volumen de marcaje Ki67 cuantificado mediante densitometría

en los tres grupos experimentales estudiados: (A) animales TLR4^{+/+} con oclusión distal, TLR4^{-/-} con oclusión proximal, y (B) TLR4^{+/+} con oclusión proximal a los 3 tiempos analizados. Los resultados se representan como la media \pm EEM (* $p < 0,05$ vs. *sham*, ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni, $n=6$).

El patrón de proliferación seguido fue similar para los dos fenotipos. Por un lado, se observó que tanto en los animales TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-} existe un efecto bilateral de la isquemia en las dos ZSV, la ipsilesional y la contralesional y, además, dicha bilateralidad se mantiene a lo largo del tiempo. En cuanto a los cambios observados, 24 horas tras la isquemia experimental se observó una disminución significativa del volumen de células Ki67⁺, seguido de una recuperación a los 7 y 14 días (**Figura 4.14A**). Cuando realizamos este mismo estudio en animales TLR4^{+/+} con oclusión proximal, se observó un incremento de la proliferación a los 7 días de la isquemia comparando con los niveles de proliferación del *sham* (**Figura 4.14B**), semejante al observado a los 14 días en el **bloque I**.

La representación del volumen de infarto frente al volumen de células proliferativas en los animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} mostró una correlación positiva en el caso de los animales TLR4^{+/+} mientras que no observamos ningún tipo de correlación en los animales TLR4^{-/-} (**Figura 4.15**).

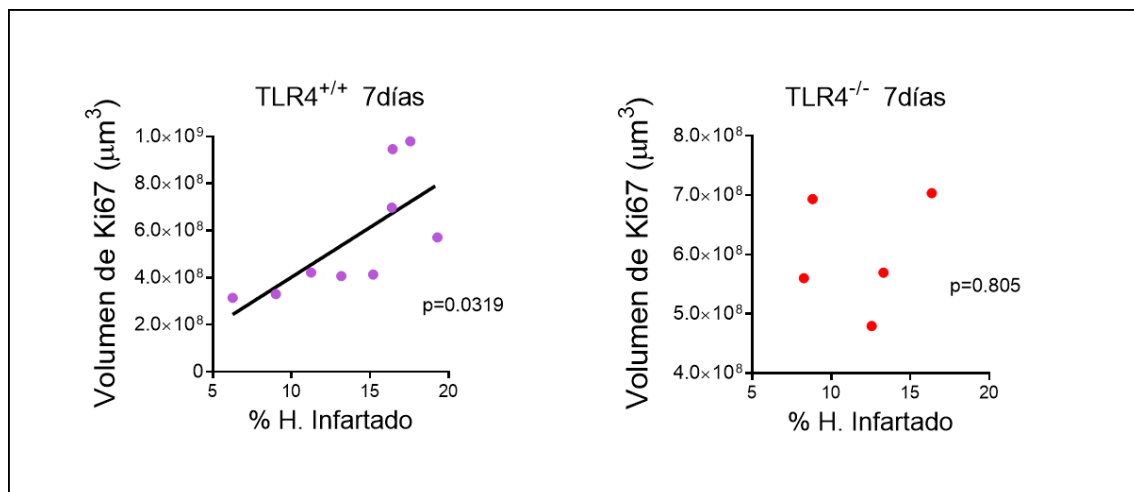


Figura 4.15. Regresiones lineales que muestran la correlación entre el % de hemisferio infartado y el volumen de Ki67.

A continuación, procedimos a la comparación del volumen de células Ki67⁺ en la ZSV ipsilateral entre los animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con tamaño de infarto similar. En

condiciones basales, los animales deficientes en TLR4 presentaron un mayor volumen de células Ki67⁺ que los ratones TLR4^{+/+}, resultado que se conservó en los animales *sham*, lo que indica que la cirugía *per se* no tiene un efecto significativo en este parámetro. Tras isquemia, a las 24 h tras la oclusión, se observó una disminución de células proliferando en la ZSV en los animales tanto TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-}, con un mayor volumen de células Ki67⁺ en los animales TLR4^{+/+}. A los 7 y 14 días tras isquemia, los valores se recuperaron, observándose en este caso un mayor número de células Ki67⁺ en los animales TLR4^{-/-} (Figura 4.16).

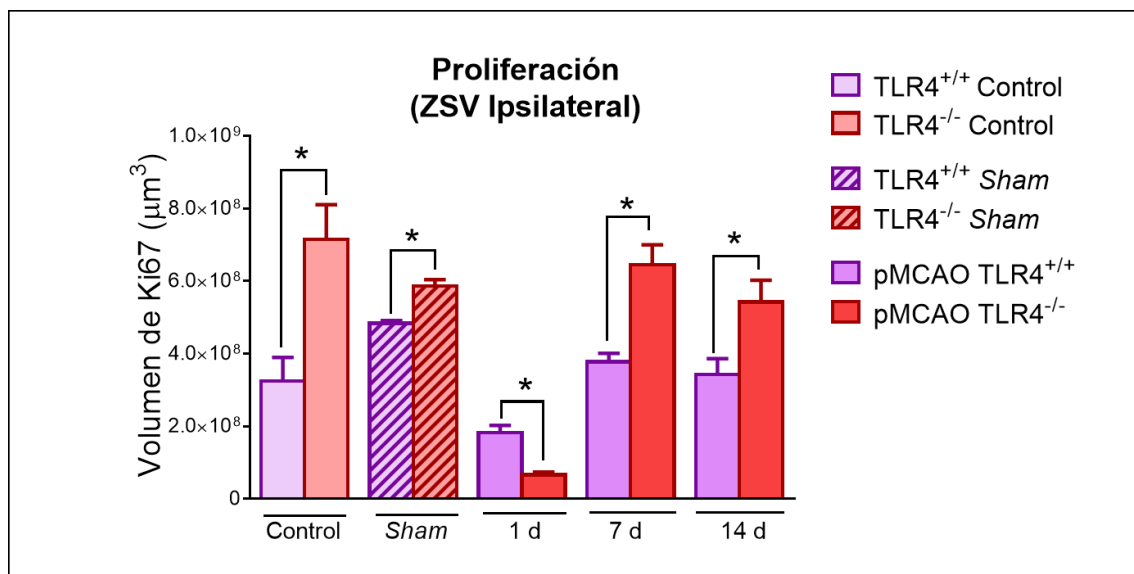


Figura 4.16. Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV tras una isquemia experimental en animales con tamaño de infarto similar. Las células en fase activa del ciclo celular se cuantificaron mediante inmunohistoquímica de Ki67 comparando animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} a los distintos tiempos estudiados tras isquemia. Los resultados se representan como la media \pm EEM (* $p < 0.05$ vs. TLR4^{+/+}, $n=6$).

Analizamos, igualmente, la proliferación en animales TLR4^{+/+} con oclusión proximal. Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de presentar un infarto significativamente mayor que los dos grupos de estudio anteriormente citados, no se observaron cambios en la proliferación a las 24 horas respecto a los animales TLR4^{+/+} con oclusión distal, siendo, en ambos casos, significativamente mayor que la correspondiente en animales TLR4^{-/-}. A los 7 y 14 días tras isquemia, el volumen de células Ki67 fue similar al observado en animales TLR4^{-/-} y significativamente superior a los obtenidos para la oclusión distal de TLR4^{+/+} (Figura 4.17), posiblemente debido a

las diferencias ya comentadas dependientes del volumen de infarto en los animales *wildtype*.

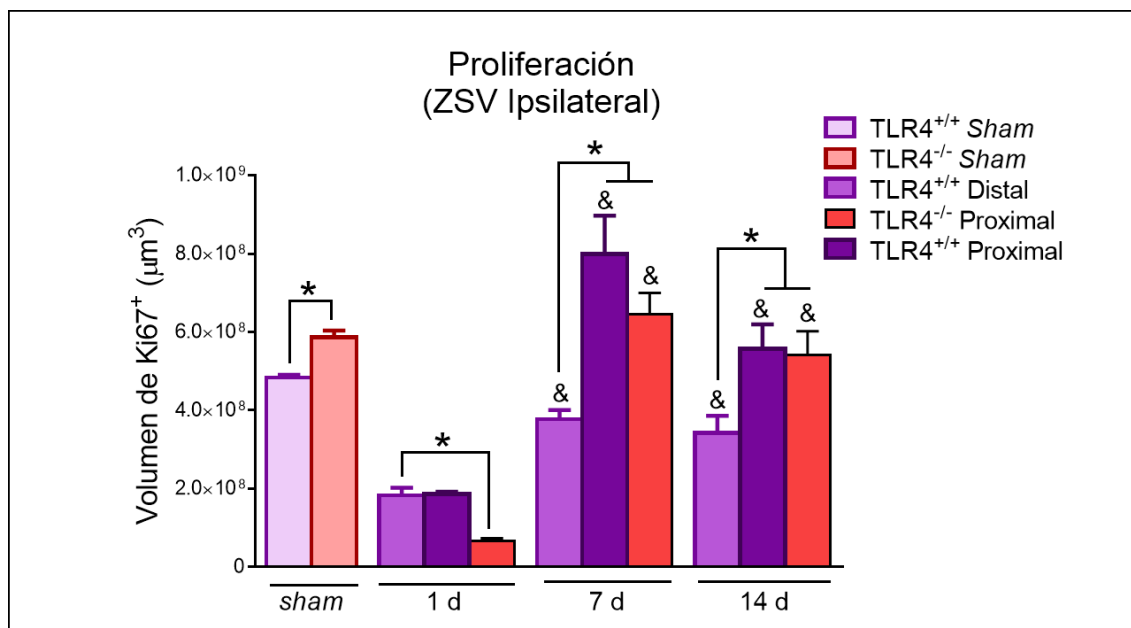


Figura 4.17. Efecto de TLR4 y del volumen de infarto en la proliferación en la ZSV tras una isquemia experimental. Los resultados se representan como la media \pm EEM (* $p < 0,05$ vs. TLR4^{+/+} distal, & $p < 0,05$ vs. 1d, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni)

4.2.2.2.- Efecto de la activación de TLR4 en CMNs de ratón adulto *in vitro*

Para confirmar las diferencias en la proliferación dependientes de la presencia o ausencia de TLR4 24 horas tras isquemia, y, conociendo que tras una isquemia experimental se liberan DAMPs (HMGB1 entre otros) que activan TLR4, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* utilizando CMNs aisladas de ZSV de ratón adulto, tratadas o no con agonistas TLR4. Como se puede observar, la activación de TLR4 con LPS, un PAMP específico de TLR4, así como con el ligando HMGB1, inducen un incremento en la proliferación de las CMNs, cuantificado como un aumento del tamaño de neuroesfera generado, comparado con el bloqueo específico del receptor (LPSRS). Además, estudiando las neuroesferas de distinto tamaño (0-100 μm -diámetro pequeño-, 100-150 μm -diámetro mediano- y mayor de 150 μm -diámetro grande-), se observa que el tratamiento con LPS y HMGB1 genera un mayor porcentaje de neuroesferas grandes a expensas de una disminución de neuroesferas de menor tamaño, tanto respecto al bloqueo del receptor como al tratamiento con el vehículo (**Figura 4.18**).

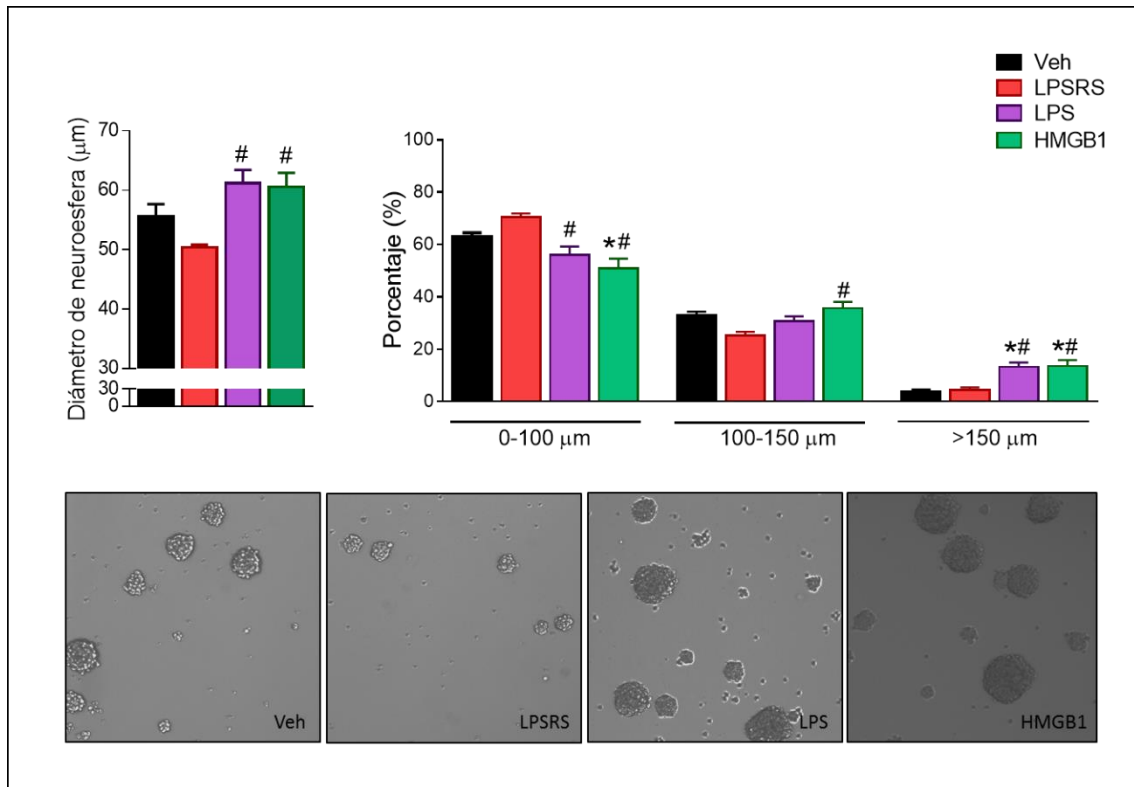


Figura 4.18. Efecto de la activación de TLR4 sobre la proliferación de CMNs adultas. Las CMNs fueron aisladas de ratones adultos C57BL/6 y puestas en cultivo a una densidad de 10.000 células por pocillo en presencia de medio, LPS, LPSRS o HMGB1, todos ellos a una concentración de 100 ng/mL. Los diámetros de las neuroesferas (se cuantificaron 60-100 neuroesferas por condición) fueron medidos tras 5 días en cultivo; se calculó el diámetro medio y el porcentaje de neuroesferas, clasificadas por tamaños. Para todos los experimentos, los resultados se representan como la media \pm EEM ($\#p < 0,05$ vs. LPSRS, $*p < 0,05$ vs. medio, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni, $n=4$)

4.2.2.3.- Efecto de TLR4 en las poblaciones de CMN y CPN de la ZSV *in vivo*

El siguiente paso fue analizar por separado las poblaciones de CMNs y CPNs presentes en el nicho neurogénico *in vivo*. El análisis por citometría de flujo utilizando la combinación de marcadores prominina-1, EGFR, GFAP y Mash-1, característicos de los tipos celulares de interés (ver **Figura 4.19A**), produjo los siguientes resultados:

En condiciones basales, no se observaron diferencias entre el porcentaje total de CMNs y CPNs (células prominina-1⁺) en ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}. Tampoco se observaron diferencias en las de tipo quiescente (prominina-1⁺/EGFR⁻) ni en las proliferativas (prominina-1⁺/EGFR⁺) (**Figura 4.19B**).

El análisis 24 horas tras isquemia tampoco mostró cambios en el total de células prominina-1⁺ ni en el porcentaje de células B quiescentes. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica de Ki67, se observó un menor porcentaje de CMNs y CPNs proliferativas (prominina-1⁺/EGFR⁺, en las que se incluyen las células tipo B activadas y tipo C) en los ratones tanto TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-} comparado con sus correspondientes animales *sham* (Figura 4.19B).

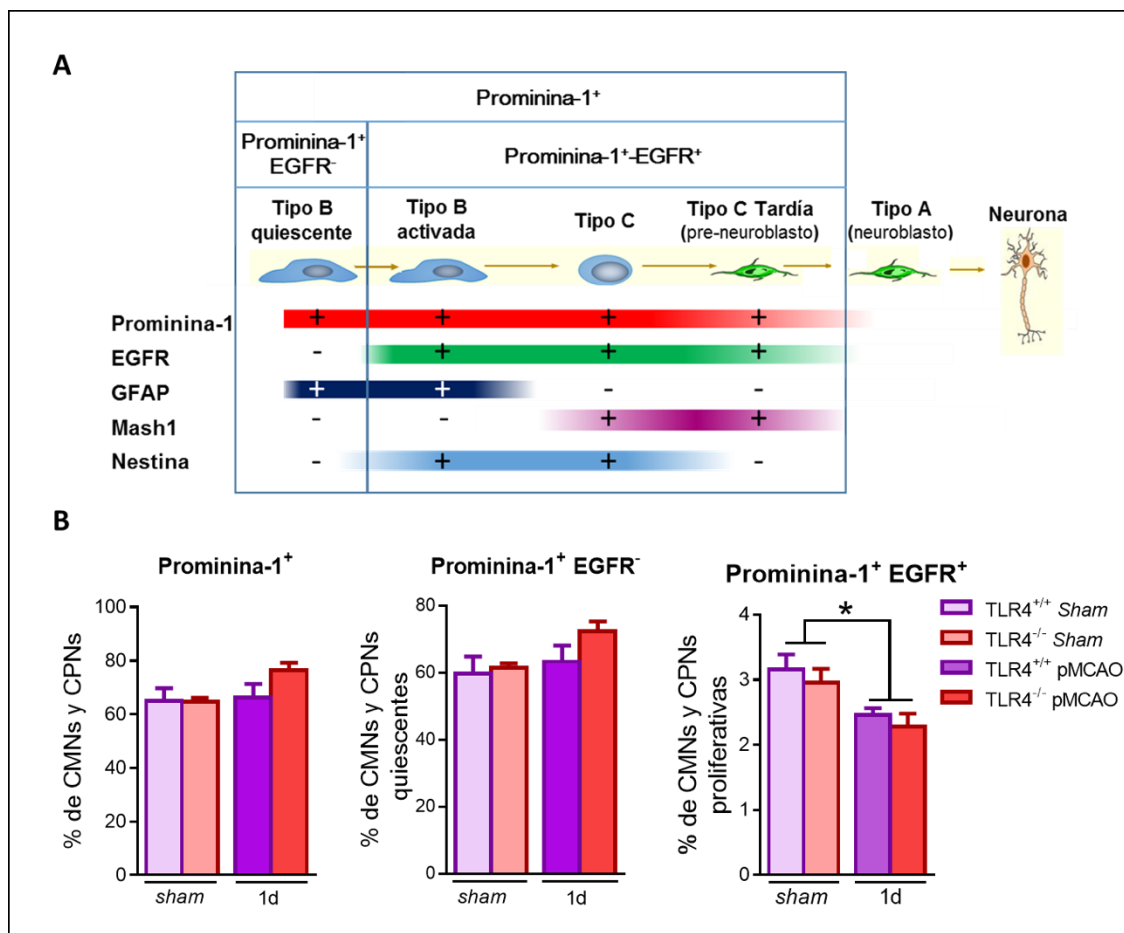


Figura 4.19. Efecto de TLR4 en el estado proliferativo de las CMNs y CPNs presentes en la ZSV 24 horas tras una isquemia experimental. (A) Esquema de los marcadores celulares seleccionados para la identificación de los tipos celulares. (B) Se representa el porcentaje del total de CMNs y CPNs (Prominina-1⁺) y, dentro de ellas, las que corresponden a un estado quiescente (prominina-1⁺EGFR⁻) o proliferativo (prominina-1⁺EGFR⁺). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=4-5 *sham*, 7-8 pMCAO, *p<0,05, ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni).

El estudio por separado de las principales poblaciones de la ZSV, empleando los marcadores celulares previamente mencionados (Figura 4.20A), dio lugar a los siguientes resultados:

En condiciones basales, el análisis del porcentaje de *células de tipo B activadas* (prominina-1⁺/EGFR⁺/GFAP⁺) y de *células de tipo C* (prominina-1⁺/EGFR⁺/Mash-1⁺) no mostró cambios en ratones TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} (Figura 4.20). Sin embargo, 24 horas tras la isquemia, los ratones TLR4^{-/-} mostraron un menor porcentaje de células de tipo B activadas comparado con el obtenido en los ratones TLR4^{+/+}. Además, también se observó, comparado con su basal, un porcentaje inferior de células de tipo C tras isquemia en los animales TLR4^{+/+}, porcentaje que en los animales TLR4^{-/-} no se vio alterado (Figura 4.20B).

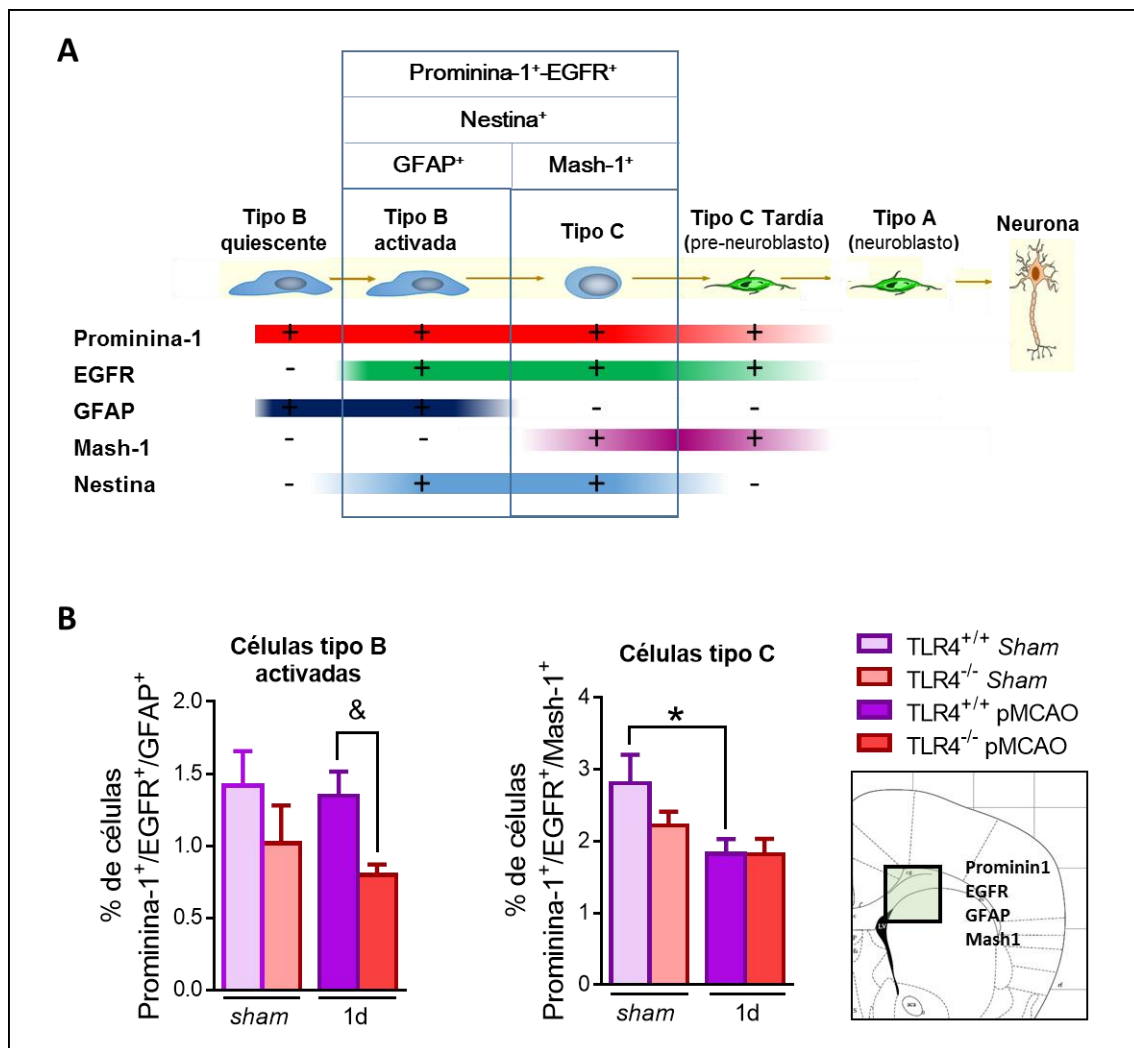


Figura 4.20. Efecto de TLR4 en el porcentaje de células de tipo B activadas y células de tipo C en la ZSV 24 horas tras isquemia experimental. (A) Esquema de los marcadores celulares seleccionados para la identificación de los tipos celulares. (B) Los resultados se representan como el porcentaje de células de cada población estudiada respecto al total de células aisladas de la ZSV mostrados como la media \pm EEM (n=4-5 sham, 7-8 pMCAO, &p<0.05 vs. TLR4^{+/+} pMCAO, *p<0.05 vs. TLR4^{+/+} sham. ANOVA de 2-factores, post-test de Bonferroni).

4.2.3.- Efecto de TLR4 en la migración eutópica y ectópica de neuroblastos tras una isquemia cortical

4.2.3.1.- Efecto de TLR4 en la migración eutópica de neuroblastos hacia el BO

Como se ha descrito anteriormente, en una situación fisiológica, los neuroblastos generados en la ZSV siguen una migración rostral a través de la RMR al BO. En estado basal, tanto en animales control como *sham*, los animales TLR4^{-/-} presentaron un mayor volumen de células DCX⁺ migrando a través de dicha ruta comparado con los animales TLR4^{+/+} (Figura 4.21, $p < 0.05$ TLR4^{+/+} vs. TLR4^{-/-}).

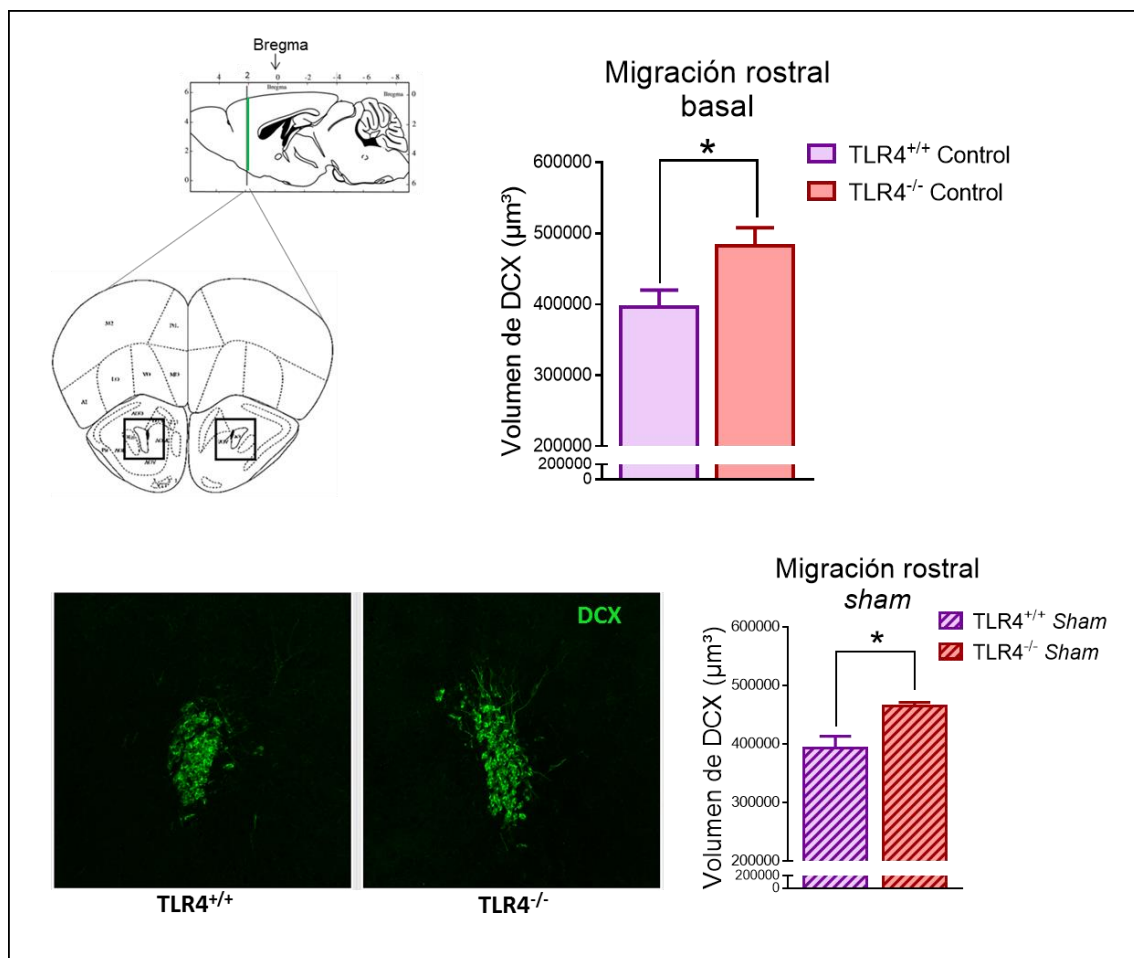


Figura 4.21. Efecto de TLR4 en la migración basal de los neuroblastos a través de la RMR. Se establecieron como campos de análisis los correspondientes a la RMR de dos cortes consecutivos separados 320 μm y se analizaron las imágenes tomadas, de animales control y *sham*, mediante densitometría. Los datos se representan como medias ± EEM (* $p < 0.05$ TLR4^{+/+} vs. TLR4^{-/-}, $n = 6-7$ controles, $n = 4$ *sham*, distribución *t* de Student, post-test Mann-Whitney).

A continuación, se analizó el efecto de la isquemia sobre dicha migración. Como se observa en la Figura 4.22, y, corroborando el resultado obtenido en el bloque I,

aunque en este caso con un tamaño de infarto significativamente menor (oclusión distal de la ACM), la isquemia induce a las 24 horas en los animales TLR4^{+/+} un incremento en el volumen de células DCX⁺ migrando a través de la RMR, que revierte a las 48 horas de la misma. Por otro lado, los animales TLR4^{-/-} no presentaron cambios ni a las 24 ni a las 48 horas de la isquemia comparado con su basal.

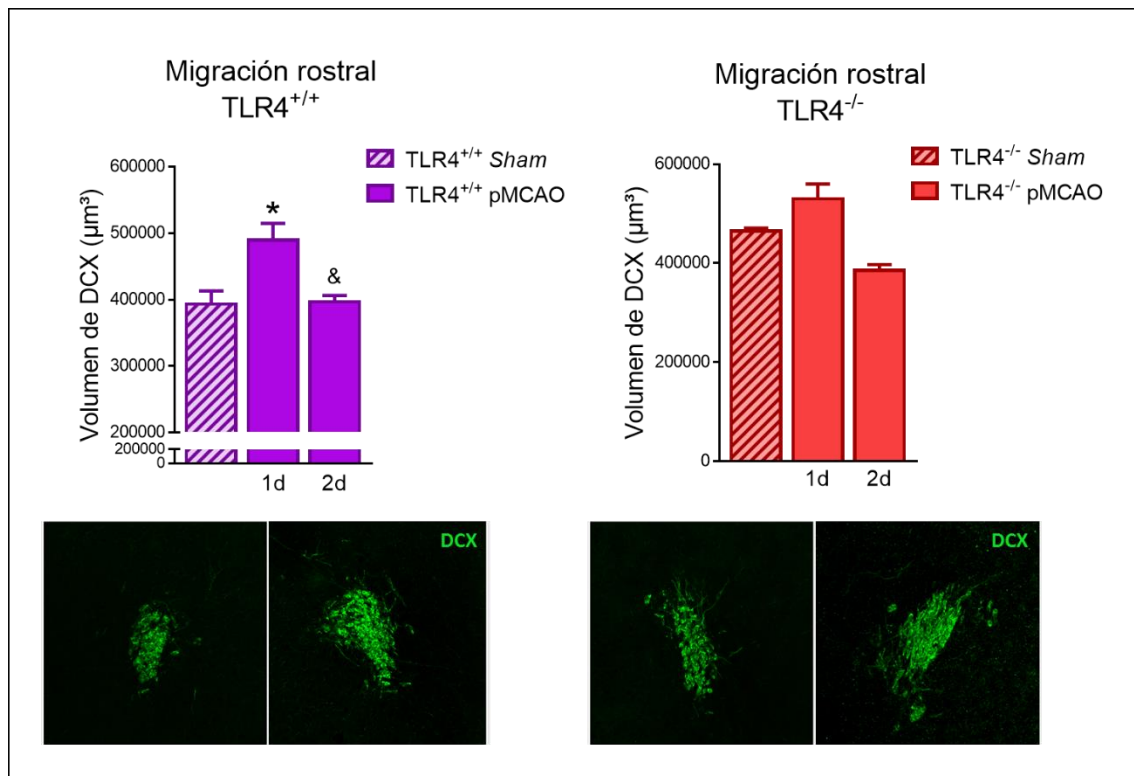


Figura 4.22. Efecto de TLR4 en la migración eutópica de los neuroblastos a través de la RMR en la fase aguda de una isquemia experimental. Se muestran los datos obtenidos en el análisis densitométrico de imágenes correspondientes a los animales *sham* e isquémicos, TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, a las 24 y 48 horas de la cirugía. Asimismo, se muestran imágenes representativas seleccionadas de un animal *sham* e isquémico sacrificado a las 24 horas. Los datos se representan como medias ± EEM (*p<0.05 vs. *sham*, & p<0.05 vs. tiempo anterior, n=4-5)

4.2.3.2.- Efecto de TLR4 sobre la expresión de mediadores neurogénicos en la corteza peri-infarto

Como se ha comentado en la introducción, estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que, tras una isquemia experimental, los ratones deficientes en TLR4 presentaban un retraso en la migración de neuroblastos desde la ZSV al área de daño isquémico a los 7 y 14 días tras el infarto cerebral (Moraga et al., 2014). Para buscar explicación a este hecho, decidimos estudiar los mecanismos implicados en este

proceso por medio de un análisis temporal de la expresión génica mediante RT-qPCR de moléculas quimio-atrayentes (MCP-1, SDF-1 α), moléculas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 β), factores de crecimiento (BDNF, VEGF-A) y proteasas (MMP-9), en la corteza infartada tras la isquemia experimental. Estas moléculas están implicadas, de una forma u otra, en migración de neuroblastos u otras etapas de la neurogénesis.

Como diseño experimental se llevó a cabo una isquemia cerebral cortical en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} (oclusión distal y proximal, respectivamente) con posterior sacrificio a 1, 3 ó 7 días tras la misma (**Figura 4.23A**). La cuantificación del porcentaje de hemisferio infartado a las 24 horas de la isquemia mostró que no existían diferencias entre grupos, de tal modo que los resultados que se obtengan serán debidos a la presencia o ausencia del receptor y no a diferencias en el tamaño de infarto (**Figura 4.23B**).

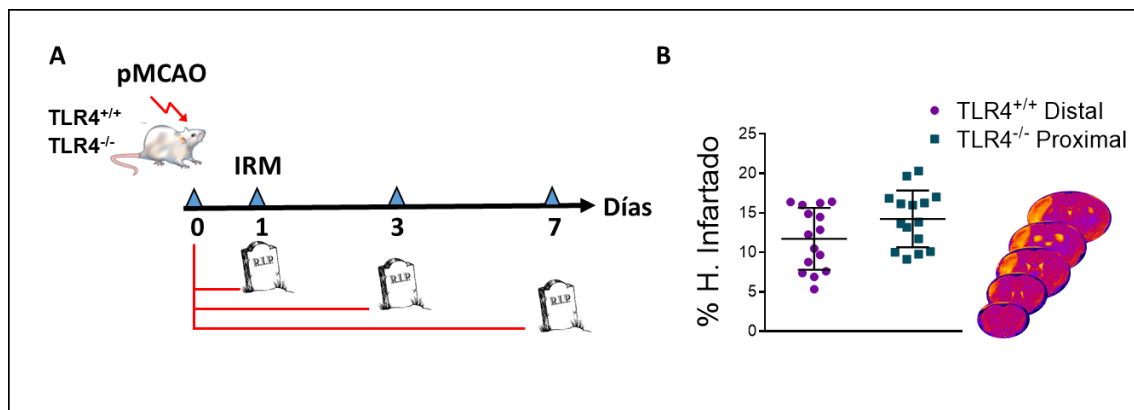


Figura 4.23. Protocolo experimental para el estudio del mecanismo de migración de neuroblastos. (A) El diseño experimental consistió en el análisis de la expresión de mediadores neurogénicos en la corteza peri-infarto de animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} con oclusión distal y proximal, respectivamente, sacrificados los días 1, 3 y 7 tras la isquemia experimental. (B) La cuantificación del volumen de infarto a las 24 horas mediante IRM no dio lugar a diferencias entre los grupos estudiados. Los datos se representan como medias \pm EEM (n=15-16).

Para analizar si el proceso quirúrgico en sí mismo influía en la transcripción de los genes estudiados, se analizó la expresión de los mismos en animales control y *sham* de ambos fenotipos. No se observaron diferencias significativas a nivel transcripcional en ninguno de ellos (**Figura 4.24**).

Tras isquemia, la comparación de la expresión de ARNm de las moléculas analizadas dio lugar a diferencias tanto a nivel temporal como dependientes del fenotipo (**Figuras 4.25, 4.26 y 4.27**).

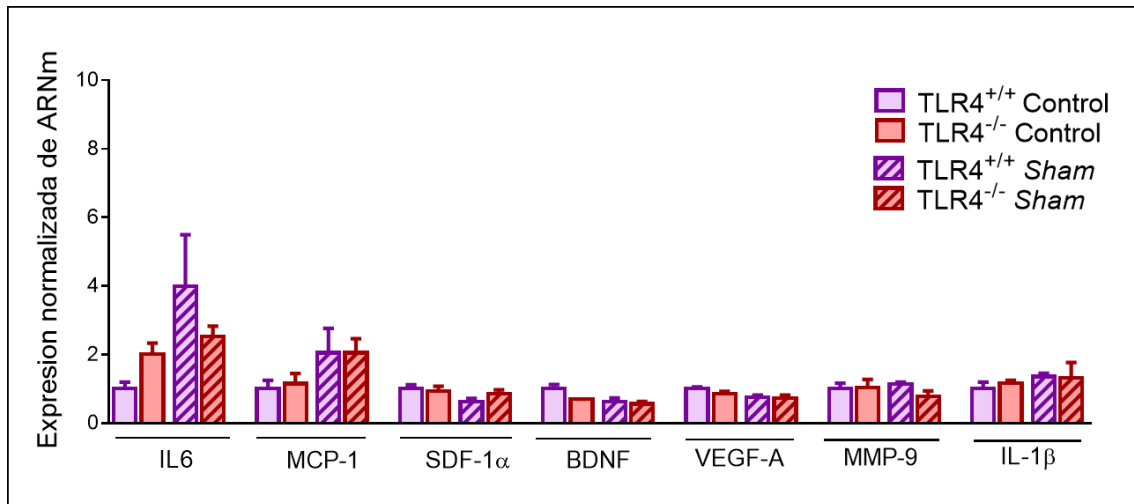


Figura 4.24. Efecto de la cirugía en la expresión de ARNm de distintos mediadores neurogénicos.

La expresión de ARNm en animales control y *sham* de ambos fenotipos, se cuantificó mediante RT-qPCR con posterior normalización respecto a los niveles de animales TLR4^{+/+} control. Los datos se representan como medias \pm EEM (n=4-5).

El análisis de la expresión de IL-6 mostró un incremento significativo a las 24 horas de la isquemia respecto a los niveles basales, sin diferencias entre fenotipos; sin embargo, a los 3 días, los animales TLR4^{-/-} presentaban niveles, rozando la significación, superiores a los de los animales TLR4^{+/+}. En los dos grupos experimentales la expresión a los 7 días fue similar a la de sus correspondientes basales (Figura 4.25).

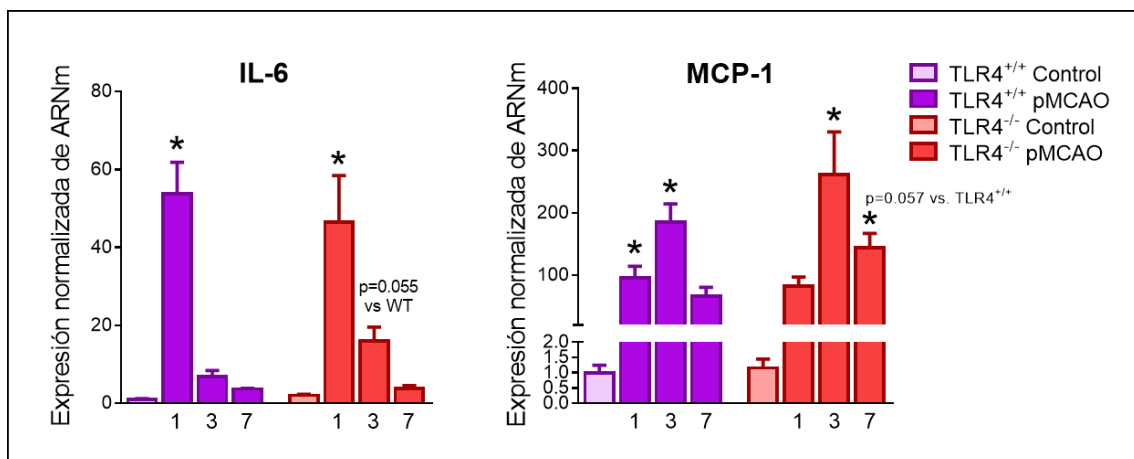


Figura 4.25. Perfil temporal de la expresión de ARNm de IL-6 y MCP-1. La expresión de ARNm en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, en condiciones basales y a 1, 3 y 7 días tras la isquemia, se cuantificó mediante RT-qPCR con posterior normalización respecto a los niveles de animales TLR4^{+/+} control. Los datos se representan como medias \pm EEM (*p<0.05 vs. control, ANOVA de 2-factores, post-test Bonferroni, n=4-5).

En el caso de MCP-1, a las 24 horas se produjo un incremento significativo de los niveles en los animales TLR4^{+/+}, que se mantuvo a los 3 días y desapareció a los 7 días. En los animales TLR4^{-/-}, sin embargo, este incremento se alcanzó posteriormente, a los 3 días, y a los 7 aún perduraba (**Figura 4.25**).

Respecto a SDF-1 α , se produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm en animales TLR4^{+/+} a los 3 días tras la isquemia, mientras que en los animales TLR4^{-/-} a dicho tiempo no se observaron diferencias respecto a los niveles de expresión basal. A los 7 días, en los animales TLR4^{+/+} disminuyó la expresión perdiendo la significación mientras que en los TLR4^{-/-} se observó un aumento similar al observado a los 3 días en los animales TLR4^{+/+}.

En lo que concierne a BDNF, tras una disminución de los niveles de transcripción similar en los animales de ambos fenotipos a los 3 días tras isquemia, a los 7 días los niveles se habían recuperado en los animales TLR4^{+/+} pero no así en los TLR4^{-/-} (**Figura 4.26**).

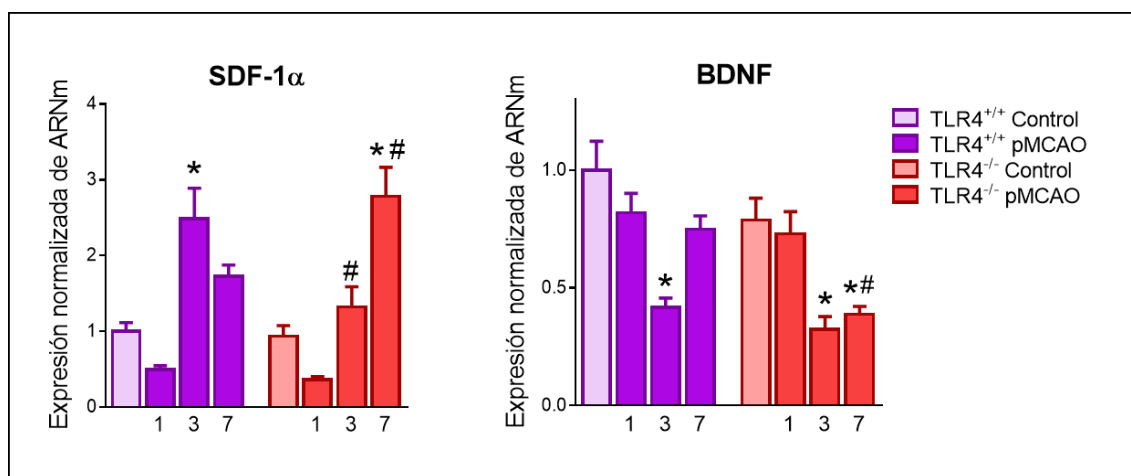


Figura 4.26. Perfil temporal de la expresión de ARNm de SDF-1 α y BDNF. La expresión de ARNm en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, en condiciones basales y a 1, 3 y 7 días tras la isquemia, se cuantificó mediante RT-qPCR con posterior normalización respecto a los niveles de animales TLR4^{+/+} control. Los datos se representan como medias \pm EEM (*p<0.05 vs. control, #p<0.05 vs. TLR4^{+/+}, ANOVA de 2-factores, post-test Bonferroni, n=4-5).

En el análisis de VEGF-A se observó una disminución en la expresión a las 24 horas en los animales TLR4^{+/+}, tras lo cual esta molécula no vio alterada su transcripción a lo largo de tiempo en ninguno de los dos fenotipos. IL-1 β , por otro lado, incrementó

sus niveles en los dos grupos a los 3 días tras la isquemia, siendo estos niveles de expresión significativamente superiores en el animal TLR4^{-/-} (Figura 4.27).

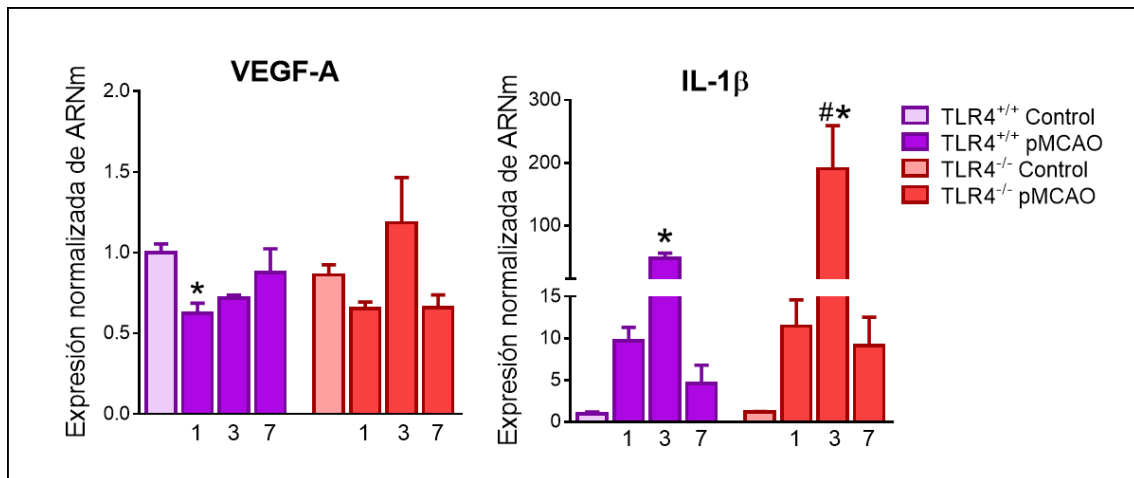


Figura 4.27. Perfil temporal de la expresión de ARNm de VEGF-A y IL-1β. La expresión de ARNm en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, en condiciones basales y a 1, 3 y 7 días tras la isquemia, se cuantificó mediante RT-qPCR con posterior normalización respecto a los niveles de animales TLR4^{+/+} control. Los datos se representan como medias \pm EEM (*p<0.05 vs. control, #p<0.05 vs. TLR4^{+/+}, ANOVA de 2-factores, post-test Bonferroni, n=4-5).

Por último, el análisis de la expresión de MMP-9 mostró un incremento de sus niveles a los 3 días tras la isquemia en los dos grupos, sin diferencias significativas entre fenotipos (Figura 4.28).

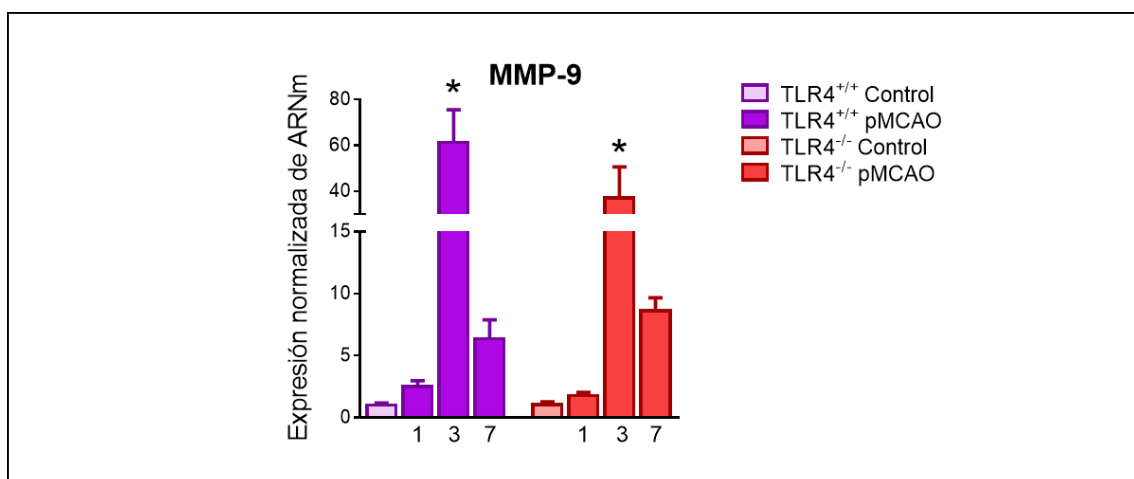


Figura 4.28. Perfil temporal de la expresión de ARNm de MMP-9. La expresión de ARNm en animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, en condiciones basales y a 1, 3 y 7 días tras la isquemia, se cuantificó mediante RT-qPCR con posterior normalización respecto a los niveles de animales TLR4^{+/+}

control. Los datos se representan como medias \pm EEM (* $p < 0.05$ vs. control, ANOVA de 2-factores, post-test Bonferroni, $n = 4-5$).

4.2.4.- Efecto de la modulación farmacológica de TLR4 en la expresión de mediadores neurogénicos en cultivo de astrocitos

El resultado anterior mostró que la deficiencia en TLR4 altera la expresión de algunos posibles mediadores neurogénicos. El siguiente paso fue, por tanto, estudiar *in vitro* la posible implicación de los astrocitos en este proceso. Para ello, se activó de manera selectiva el TLR4 de los astrocitos con LPS a una concentración de 100 ng/mL y se analizaron, a distintos tiempos, las moléculas que habíamos estudiado previamente *in vivo*. Además, para observar si existía una activación basal de TLR4, se trataron los astrocitos con el antagonista específico LPSRS y se comparó la expresión de moléculas con las correspondientes al cultivo con vehículo (expresión basal) (**Figura 4.29**).

La variación en la expresión de estas moléculas se estudió a dos tiempos que permitieran observar incrementos en la expresión tempranos (24 h) y tardíos (48 h). Tanto a 24 como a 48 horas se produjo un incremento significativo en la expresión de IL-6, MCP-1, SDF-1 α , IL-1 β y MMP-9 debido a la activación del TLR4 de los astrocitos. Por otro lado, la expresión de BDNF incrementó al tiempo más tardío, 48 horas. Asimismo, la única molécula analizada que no presentó cambios significativos en su expresión tras la estimulación de TLR4 fue VEGF-A. El tratamiento con el antagonista específico LPSRS no mostró cambios en la expresión de las moléculas estudiadas respecto a los niveles basales con vehículo.

Para verificar que la expresión de estas moléculas era debida a la activación de TLR4 de manera selectiva, los astrocitos obtenidos de animales TLR4^{-/-} fueron tratados con LPS durante 24 horas, tiempo al cual ya observábamos diferencias de expresión en la mayoría de moléculas estudiadas en los astrocitos TLR4^{+/+}, y se midieron de nuevo por RT-qPCR las moléculas analizadas previamente. No se observaron cambios significativos en la expresión de ninguna de ellas.

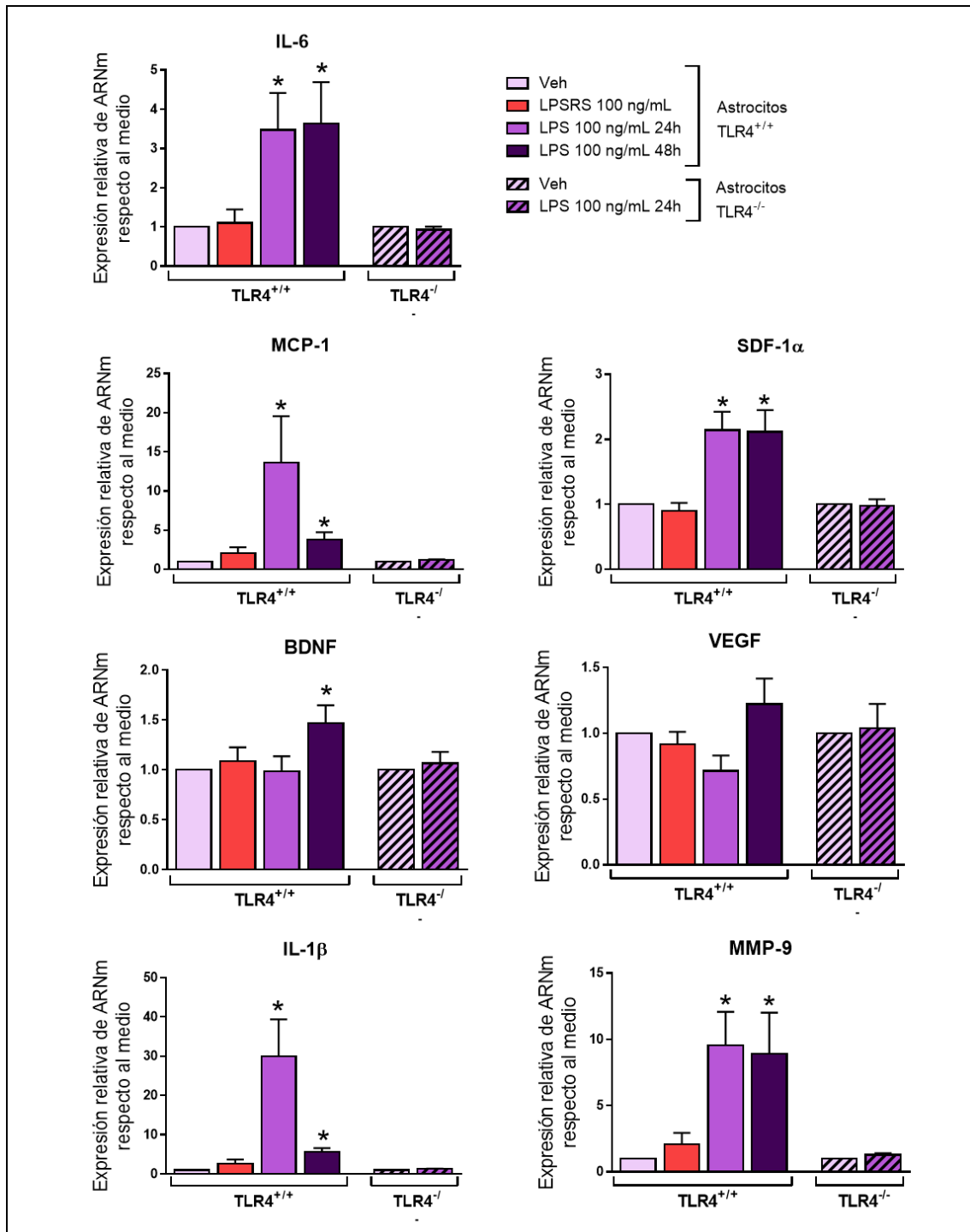


Figura 4.29. Perfil temporal de la expresión de mediadores neurogénicos tras la activación específica de TLR4 en cultivo celular de astrocitos. Los valores muestran la expresión de ARNm de IL-6, MCP-1, SDF-1 α , BDNF, VEGF-A, IL-1 β y MMP-9 cuantificada mediante RT-qPCR. Asimismo, la expresión basal de dichas moléculas se analizó con el bloqueo de TLR4 mediante tratamiento con el antagonista específico LPSRS. La expresión debida a uniones no específicas del ligando se analizó con el tratamiento en astrocitos aislados de animales TLR4^{-/-}. Cada experimento se realizó con cultivos independientes y por triplicado (n=5). Los resultados se

representan como medias \pm EEM normalizadas respecto a la expresión basal registrada (* $p < 0.05$ vs. vehículo, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni).

4.2.5.- Efecto de la activación de TLR4 sobre la migración de neuroblastos *in vitro*

Los ensayos de migración en los sistemas Transwell® se diseñaron con el objetivo de estudiar si la activación de TLR4 modula la migración de neuroblastos de forma directa sobre el receptor de las CMNs y/o indirecta a través de sustancias liberadas por los astrocitos mediante activación del receptor en estos últimos. Para ello, utilizamos CMNs y astrocitos, TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-}, tratados en presencia de distintos ligandos de TLR4 o en ausencia de los mismos (vehículo). Se utilizaron dos agonistas del receptor (LPS, PAMP específico de TLR4, y HMGB1, DAMP que, aparte de a TLR4, puede unirse a otros receptores) y un antagonista específico del receptor (LPSRS).

El efecto directo de la activación de TLR4 sobre la migración de neuroblastos se estudió en ensayos que únicamente incorporaban CMNs TLR4^{+/+}, situándolas en el compartimento superior del sistema Transwell®. Por otro lado, el efecto indirecto de dicha activación se estudió incluyendo astrocitos TLR4^{+/+} en el compartimento inferior y neuroesferas TLR4^{-/-} en el superior. Para determinar el efecto total de la estimulación de TLR4, los ensayos se realizaron tanto con astrocitos TLR4^{+/+} como con neuroesferas TLR4^{+/+}, cada uno en su correspondiente compartimento (Figura 4.30).

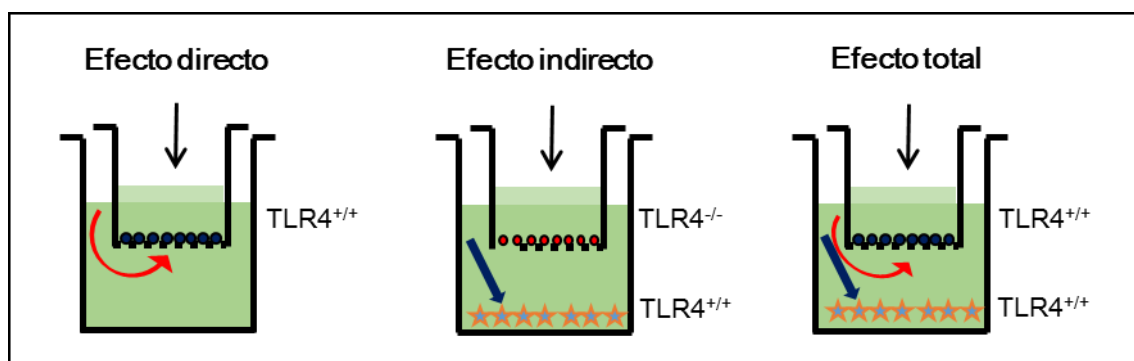


Figura 4.30. Esquema representativo de los ensayos de migración realizados mediante el sistema *in vitro* Transwell®. En el compartimento superior se sitúan las CMNs obtenidas a partir de cultivos primarios de neuroesferas de ZSV de ratón adulto, TLR4^{+/+} para los ensayos del efecto directo y efecto total y TLR4^{-/-} para el caso del estudio del efecto indirecto. En el compartimento inferior se encuentran los astrocitos, en una confluencia del 80-100%, obtenidos a partir de cultivos primarios de ratones neonatos con fenotipo TLR4^{+/+}, o medio condicionado de astrocitos (MCA) para el caso de ensayos de efecto directo.

4.2.5.1.- Puesta a punto del ensayo de migración de neuroblastos *in vitro*

Los ensayos de migración que miden el efecto de un ligando sobre las CMNs, se realizaron inicialmente con el tratamiento directo de los cultivos primarios. Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que las CMNs, en su medio de cultivo, presentaban una migración muy reducida a través del soporte de migración del sistema Transwell®, tanto en el tratamiento con el vehículo como con LPS. Debido a que las CMNs, en un sistema biológico, se encuentran rodeadas de un soporte astrocitario, se decidió realizar el mismo ensayo en presencia de un medio condicionado de astrocitos –MCA-, definiendo el mismo como medio de cultivo que ha estado en contacto con astrocitos durante 48 horas, conteniendo las moléculas liberadas por los mismos en una situación basal. En presencia de vehículo, el MCA induce en las CMNs una migración basal significativamente superior a la obtenida en ausencia de dicho medio (**Figura 4.31**).

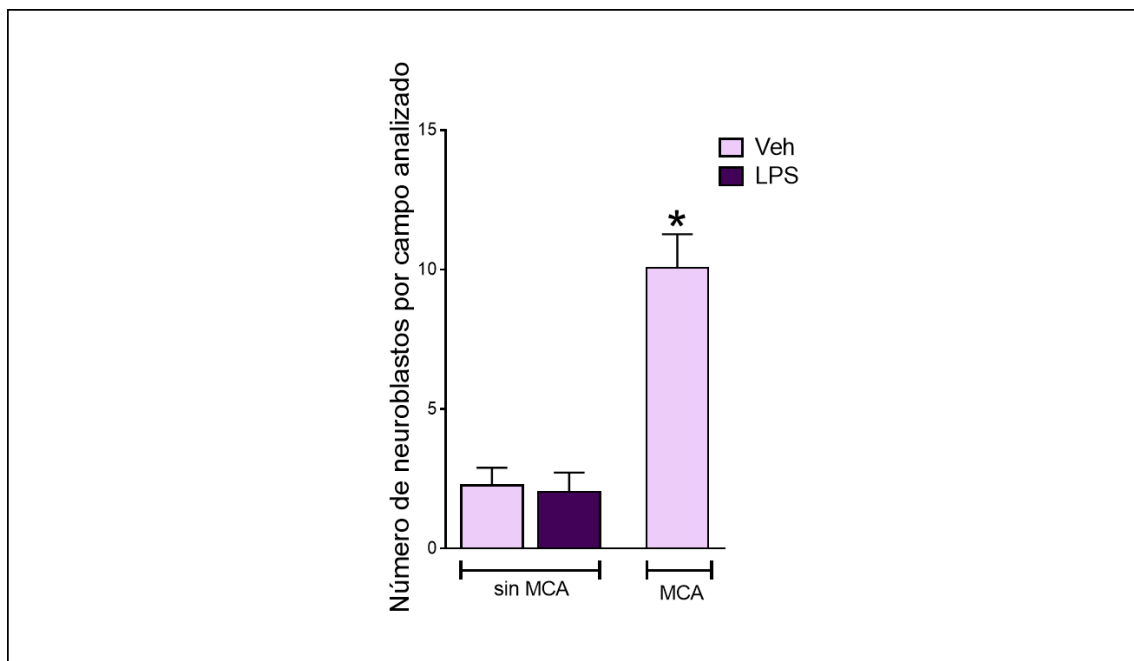


Figura 4.31. Puesta a punto del ensayo de migración de neuroblastos con el sistema Transwell®.

Tras realizar la inmunohistoquímica, se cuantificó el número de neuroblastos (células Tuj1+/Topro-3+) presentes en cada uno de los 25 campos de conteo del inserto, teniendo como condiciones de ensayo, sobre CMNs TLR4^{+/+}, la ausencia de MCA (con dos tratamientos, vehículo y LPS (n=3)), y la presencia de MCA (n=5). Los experimentos se llevaron a cabo con cultivos independientes y por duplicado. Los datos se representan como medias \pm EEM (* $p < 0.01$ vs. sin MCA). MCA: medio condicionado de astrocitos.

A partir de ahora, todos los experimentos de migración en los que se analice el efecto directo del tratamiento sobre la CMN se llevarán a cabo en presencia de MCA y las variaciones en la migración de neuroblastos debido a un tratamiento se representarán como la migración relativa respecto al bloqueo del receptor (tratamiento con LPSRS), a la cual se asignará el valor arbitrario de 100.

4.2.5.2- Efecto de LPS sobre la migración *in vitro* de neuroblastos

Los ensayos de migración de neuroblastos se clasificaron, como se ha explicado previamente, en el estudio del efecto directo, indirecto y total, del tratamiento sobre las CMNs y los astrocitos. En el estudio del efecto directo, el tratamiento de las CMNs TLR4^{+/+} con LPS mostró un incremento significativo de la migración respecto al vehículo y al bloqueo del receptor, efecto que no se observó en el caso de las CMNs de animales TLR4^{-/-} (Figura 4.32), lo que demuestra la participación directa del TLR4 presente en estas células en su migración.

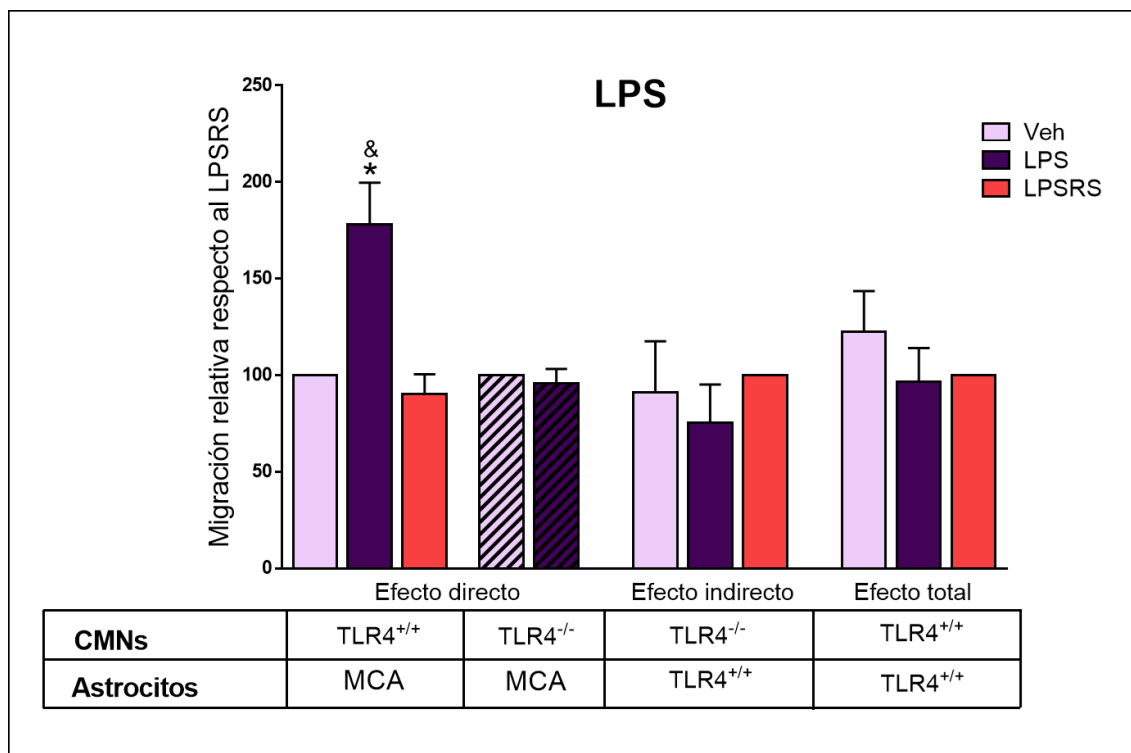


Figura 4.32. Efecto directo, indirecto y total de la activación de TLR4 con LPS sobre la migración de neuroblastos. El número de neuroblastos presentes en cada campo de conteo del inserto fue cuantificado y posteriormente representado como migración relativa respecto al bloqueo del receptor con LPSRS. Se procedió al estudio del efecto directo: CMNs TLR4^{+/+} o TLR4^{-/-}, para la comprobación de especificidad, en el compartimento superior y MCA en el compartimento inferior (n=5 y n=3, respectivamente); el efecto indirecto: CMNs TLR4^{-/-} en el compartimento superior y

astrocitos TLR4^{+/+} en el compartimento inferior (n=3, resultados preliminares), y efecto total: CMNs TLR4^{+/+} en el compartimento superior y astrocitos TLR4^{+/+} en el compartimento inferior (n=6). Cada experimento se realizó con cultivos independientes y por duplicado. Los datos se representan como medias \pm EEM normalizadas respecto a la expresión obtenida tras el bloqueo del receptor con LPSRS (*p<0.05 vs. LPSRS, &p<0.05 vs. vehículo, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni). MCA: medio condicionado de astrocitos.

Al analizar el efecto indirecto y el total, no se observaron diferencias significativas en la migración debidas al tratamiento con LPS ni respecto al vehículo ni al bloqueo del receptor.

Como se puede observar en la **figura 4.32**, a pesar de haber demostrado que la activación del TLR4 de los astrocitos con LPS inducía un incremento de la expresión de moléculas implicadas en migración de neuroblastos (**Figura 4.29**), ni el tratamiento de los astrocitos con LPS (efecto indirecto) ni el tratamiento de los dos tipos celulares (efecto total) mostraron un aumento del número de células migrando a través del inserto, lo que llevó a pensar que quizás el tratamiento provocaba toxicidad y por lo tanto, la muerte de las CMNs. Para ello, se midieron los niveles de expresión de iNOS y COX2 48 horas tras el tratamiento de los astrocitos con LPS.

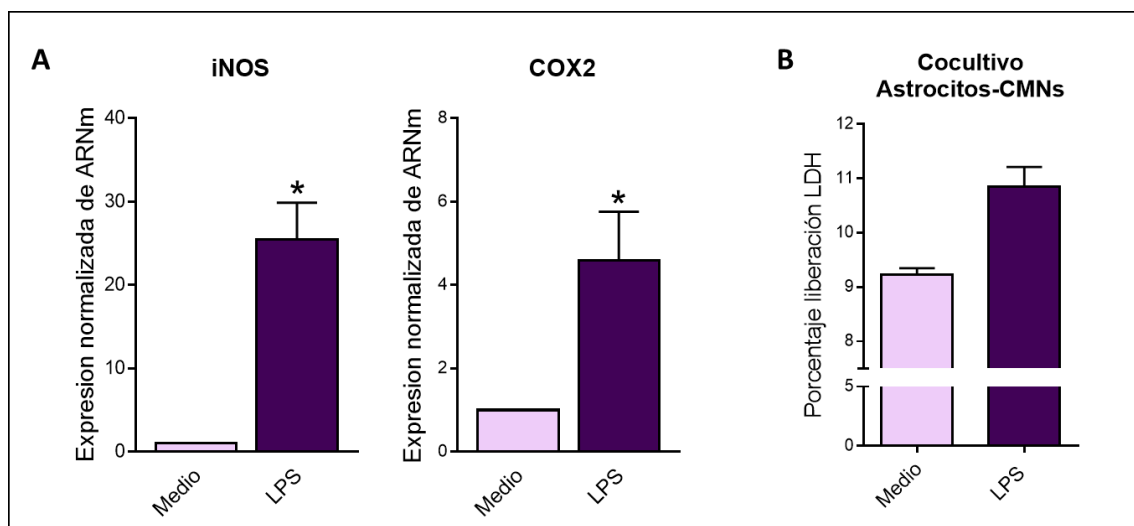


Figura 4.33. Efecto de LPS sobre la expresión de ARNm de iNOS y COX2 y sobre la viabilidad de las CMNs. (A) Los resultados de expresión normalizada se obtuvieron a partir de cultivos de astrocitos independientes (n=5), midiendo el ARNm mediante qRT-PCR por triplicado. (B) El porcentaje de liberación de LDH se cuantificó 48 horas tras el tratamiento del co-cultivo con vehículo o LPS (n=2-3, resultado preliminar). Los datos se representan como medias \pm EEM (*p<0.05 vs. vehículo, distribución *t* de *student*, post-test Mann-Whitney).

Este análisis mostró un incremento de la expresión de ARNm de ambas moléculas. Para verificar si el incremento de estas moléculas, provocaba la muerte de las CMNs, se realizó un co-cultivo de astrocitos confluentes más 40.000 CMNs, en presencia de vehículo y de LPS, y se analizó el % de liberación de LDH como marcador de viabilidad celular. Como se muestra en la **figura 4.33**, el tratamiento con LPS mostró una tendencia al incremento del porcentaje de liberación de LDH (n=2-3, resultados preliminares), lo que sugiere que al menos parte de las CMNs están muriendo impidiendo su diferenciación a neuroblastos. Debido a ello, este diseño experimental no nos permitió esclarecer la existencia de un efecto indirecto debido a la activación del TLR4 presente en astrocitos sobre la diferenciación de CMNs a neuroblastos.

4.2.5.3- Efecto de HMGB1 sobre la migración *in vitro* de neuroblastos

Con motivo de incluir en el estudio un DAMP cuya unión a TLR4 haya sido descrita, realizamos los estudios de migración, previamente descritos, con HMGB1 (**Figura 4.34**).

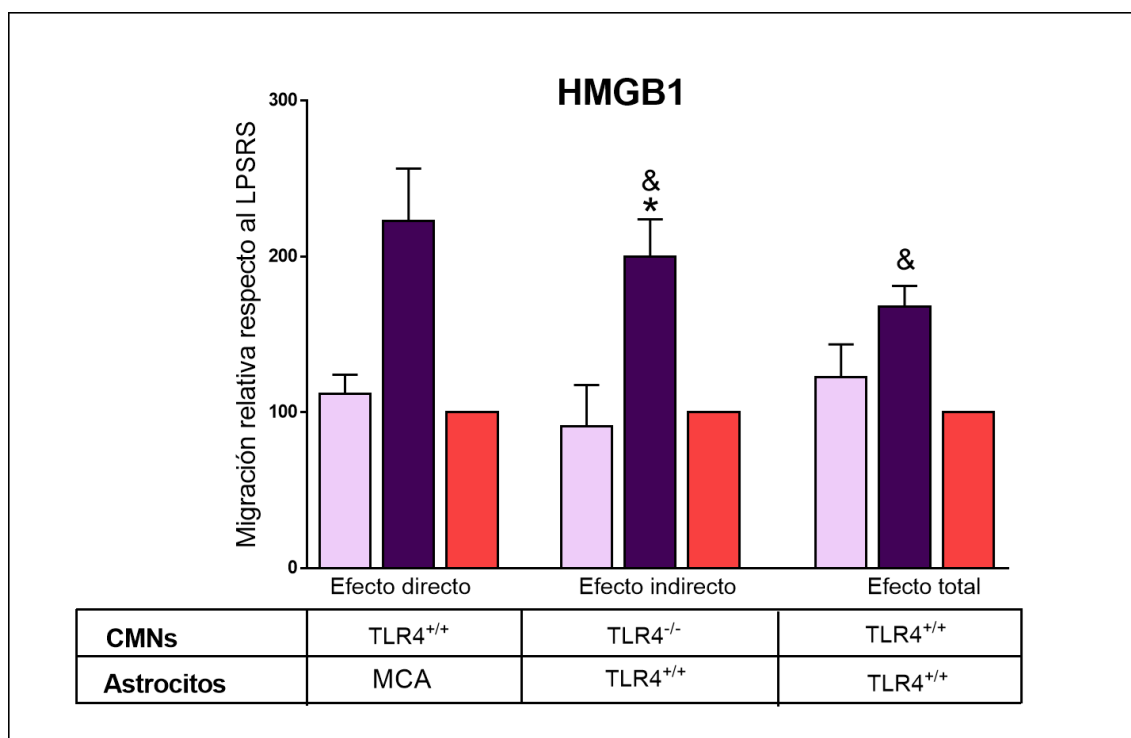


Figura 4.34. Efecto directo, indirecto y total de HMGB1 sobre la migración de neuroblastos. El estudio de los efectos directo (n=2, resultados preliminares), indirecto (n=4) y total (n=6), se realizaron tal y como se describe previamente. Cada experimento se realizó con cultivos independientes y por duplicado. Los datos se representan como medias \pm EEM normalizadas

respecto a la expresión obtenida tras el bloqueo del receptor con LPSRS (* $p < 0.05$ vs. LPSRS, && $p < 0.01$ vs. vehículo, ANOVA DE 1-factor, post-test de Bonferroni). MCA: medio condicionado de astrocitos.

El tratamiento de las CMNs con HMGB1 en presencia de MCA (efecto directo) ($n=2$, resultado preliminar) parece inducir un incremento en la migración de neuroblastos a través del inserto. Por otro lado, el análisis del efecto de HMGB1 sobre los astrocitos (efecto indirecto) produjo también el mismo efecto, tanto respecto al vehículo como al bloqueo del receptor. Por último, el tratamiento de HMGB1 sobre el TLR4 de los dos tipos celulares muestra de nuevo una migración de neuroblastos superior a la obtenida con el tratamiento con LPSRS.

Debido a que el tratamiento de los astrocitos con el ligando HMGB1 induce un aumento de la migración de los neuroblastos, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los mediadores neurogénicos analizados previamente a las 3, 6, 24 y 48 horas tras el tratamiento. No se observaron diferencias en la expresión de las moléculas analizadas excepto en la IL-6 a las 3 horas (**Figura 4.35**).

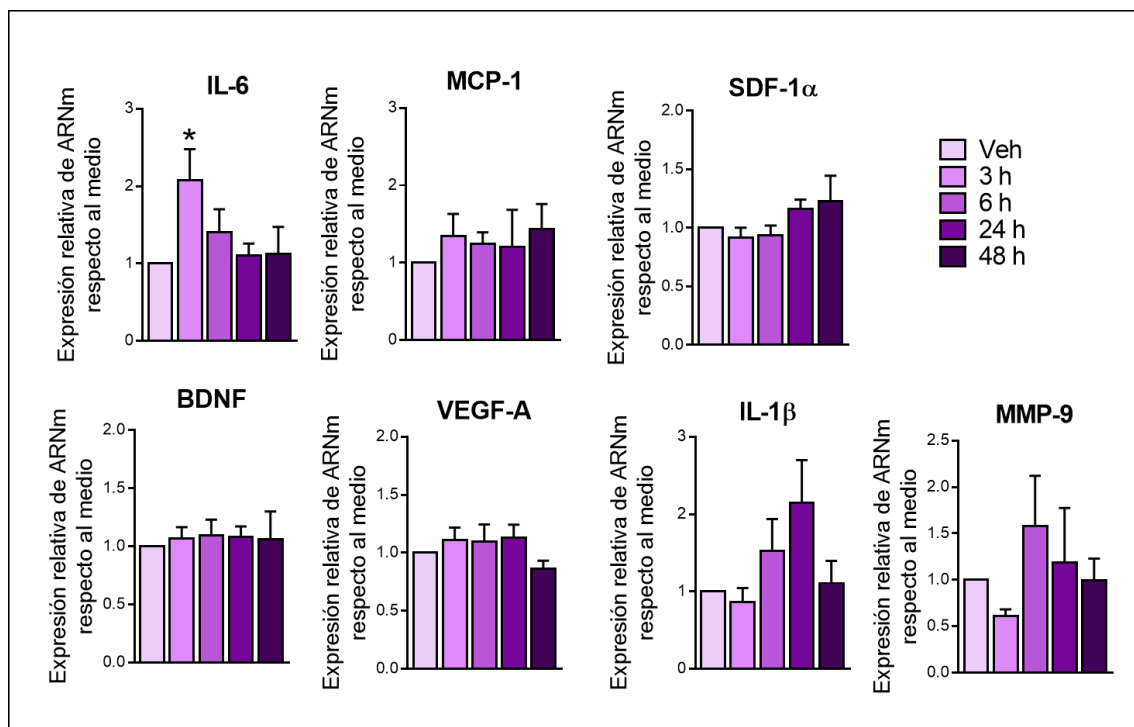


Figura 4.35. Perfil temporal de la expresión de mediadores neurogénicos tras el tratamiento de los astrocitos con HMGB1. Los valores muestran la expresión de ARNm de IL-6, MCP-1, SDF-1 α , BDNF, VEGF-A, IL-1 β y MMP-9, cuantificada mediante RT-qPCR. Cada experimento se realizó con cultivos independientes y por triplicado ($n=5$). Los datos se representan como medias

± EEM normalizadas respecto a la expresión basal registrada (* $p < 0.05$ vs. vehículo, ANOVA de 1-factor, post-test de Bonferroni).

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

BLOQUE I: Perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental

Existen numerosas evidencias experimentales que apoyan la idea de que, tras una isquemia cerebral producida en el cerebro adulto, el propio cerebro activa una serie de procesos de neurorreparación, produciendo nuevas neuronas cuya finalidad es la regeneración del mismo con la consecuente mejora funcional (Lindvall and Kokaia, 2015). Esta generación de nuevas neuronas, o *neurogénesis*, va a dar lugar a la aparición de nuevas células en zonas del cerebro en las que normalmente no ocurre, como el estriado o la corteza cerebral. La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento se centran en la neurogénesis que va a dar lugar a la aparición de nuevas neuronas en el estriado, empleando modelos animales de isquemia experimental como la inserción de un filamento a través de la ACC hasta el origen de la ACM, induciendo un daño estriatal de mayor o menor extensión dependiendo de la duración de la oclusión (Longa et al., 1989). En la presente Tesis Doctoral nos centraremos en la neurogénesis cortical, cuya evidencia está mucho menos estudiada. Para ello se empleó un modelo de isquemia cerebral cortical consistente, como se ha explicado previamente, en la ligadura mediante una seda de la ACC y de la bifurcación principal de la ACM, produciendo una lesión exclusivamente en la corteza cerebral.

Aunque existen varios estudios que no han encontrado evidencias de que exista un incremento significativo de nuevas neuronas en la corteza tras isquemia cerebral (Arvidsson et al., 2002; Zhang et al., 2001), otros han demostrado que, en ciertas condiciones, la neurogénesis cortical sí es posible (Jiang et al., 2001; Zhang et al., 2007). Sin embargo, un estudio exhaustivo y temporal de las distintas etapas que conforman la neurogénesis cortical no ha sido realizado a día de hoy. Asimismo, los escasos estudios enfocados en analizar el perfil temporal de la neurogénesis suelen comenzar cuando la enfermedad se encuentra en la fase crónica (Iwai et al., 2003; Kuge et al., 2009), obviando los cambios que se producen en la fase aguda de la misma.

Proliferación en la ZSV

En la presente Tesis Doctoral, los estudios de proliferación de la ZSV que hemos realizado demuestran que, en la fase aguda de la isquemia (24 horas), el número de

células proliferando en la ZSV es significativamente menor que el correspondiente al estado basal. Los niveles de células en proliferación se recuperaron a los 2 y 7 días tras la misma, para después experimentar un incremento a los 14 días. Posteriormente, el número de células proliferando disminuye de nuevo, alcanzando una disminución significativa respecto al nivel basal a los 28 días, similar a la observada a las 24 horas.

Hasta la fecha, gran parte de los estudios llevados a cabo acerca de la proliferación en la ZSV se han realizado mediante la cuantificación de células BrdU⁺ tras someter a los animales a inyecciones durante un determinado número de días. Esta estrategia permite valorar el número de células en proliferación en el momento de cada una de estas inyecciones, es decir, da una información de las células que proliferaban en el pasado y de manera acumulativa. Sin embargo, la inmunohistoquímica de pHis3 realizada en este bloque nos permite obtener una imagen fija del número de células que se encuentran en la fase M (mitosis) en el momento del sacrificio lo que nos permite obtener una información más clara sobre el seguimiento temporal de la proliferación.

Nuestros datos muestran un aumento de la proliferación a los 14 días tras isquemia, de acuerdo con datos previos en la literatura observados entre 7 y 14 días, dependiendo del modelo experimental de isquemia utilizado (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2004). Además, ese aumento en la proliferación también ha sido descrito en humanos, en este caso 10 días tras producirse el ictus (Marti-Fabregas et al., 2010).

Pero además, nuestros datos muestran una aparente disminución de las células en proliferación a los tiempos más tempranos, al igual que a los 28 días, no descrita anteriormente. Respecto a la fase más temprana, son escasos los estudios que hay enfocados a indagar el perfil temporal de la proliferación en la ZSV tras una isquemia, que suelen comenzar en etapas avanzadas, entre los 7 y 10 días (Iwai et al., 2003; Kuge et al., 2009), obviando los cambios que se producen en una primera etapa muy dinámica. Estos resultados podrían ser debidos a la combinación de varios mecanismos, como son 1) una disminución de la proliferación celular a dicho tiempo, 2) la inducción de muerte celular y/o 3) la rápida diferenciación a neuroblastos de las CMNs, lo que se manifestaría en un mayor número de progenitores neurales migrando a dicho tiempo, como discutiremos más adelante.

Los estudios de metabolómica realizados por RMN del LCR obtenido de animales control comparado con animales isquémicos en la fase aguda de la isquemia experimental muestran que, tras este daño cerebral, existe un incremento en la concentración de lactato, de acuerdo con estudios previos. En efecto, la isquemia, tal y como se ha explicado en la introducción, activa una serie de procesos bioquímicos conocidos como *cascada isquémica* que conllevan, entre otros procesos, a acidosis metabólica, induciendo cambios en el pH de distintos compartimentos del organismo, entre ellos el LCR (Mutch and Hansen, 1984). Se ha descrito que el aumento significativo de los niveles de lactato en las primeras horas tras un ictus isquémico lleva a una disminución en el pH del flujo sanguíneo cerebral desde 7.4 a 6.4-6.7 (Hakim and Shoubridge, 1989), evento asociado con un pronóstico poco favorable. Además, en la literatura también se ha descrito que, tras un daño cerebral, se producen cambios en la composición del LCR (Bakay et al., 1986), que pueden ser detectados por las CMNs presentes en ambas ZSVs, siendo capaces estas de responder a dichas señales con modificaciones en su proliferación o diferenciación (Lehtinen et al., 2011) debido a que los ventrículos laterales en los que se encuentra la ZSV están en contacto continuo con el LCR. Nuestros resultados demuestran que, la isquemia experimental produce una acidificación del plasma sanguíneo a las 24 horas que se revierte a las 48 horas de la misma. Además, estudios preliminares llevados a cabo en el LCR, parecen mostrar que al igual que en el plasma, tras isquemia cerebral, y, tal y como está descrito en la literatura, el LCR también sufre una acidificación. Existen estudios publicados que describen que la acidosis promueve, entre otros procesos, cambios en el metabolismo celular induciendo una disminución de la proliferación celular (Lamonte et al., 2013). Así, la acidosis observada a las 24 horas, debida al aumento de lactato en el LCR podría ser uno de los factores implicados en la disminución de la proliferación en las dos ZSVs a tiempos tempranos tras isquemia, sin embargo, serían necesarios futuros experimentos sobre el efecto de la acidosis en la proliferación de CMNs *in vitro* para corroborar este hecho.

Algunos de los mecanismos señalados también podrían explicar la disminución tardía, observada a los 28 días, si bien para este tiempo se necesitarían estudios a tiempos posteriores. En este sentido, trabajos publicados en los que se realiza un seguimiento de la proliferación en fase crónica, aunque son estudios que afectan al estriado, han

demostrado que la proliferación vuelve a sus niveles basales tras unas 6 semanas de la inducción de la isquemia (Thored et al., 2006).

Aunque en algún estudio previo en daño cerebral no isquémico se ha descrito que la proliferación en la ZSV podría ser un proceso bilateral (Szele and Chesselet, 1996), nuestro trabajo demuestra por primera vez que este proceso también se produce tras un daño isquémico.

Migración de neuroblastos a través de la RMR y hacia el daño isquémico

En este estudio, hemos dividido las zonas de migración en dos, 1) la migración rostral que siguen los neuroblastos en condiciones fisiológicas, a través de la RMR hacia el BO, a la que denominaremos *migración eutópica*, y 2) la *migración ectópica* de neuroblastos que abandonan la RMR para dirigirse hacia el área cortical dañada. A su vez, la migración ectópica se analizó, por una parte, en la zona rostral del cerebro, en la cual los progenitores tienen que recorrer una considerable distancia atravesando el cuerpo calloso para alcanzar el área dañada y, por otra, en la zona caudal del cerebro, en la cual la distancia recorrida por los neuroblastos será menor debido a la distancia de los ventrículos laterales al área de daño en dicha zona.

En una situación fisiológica, los neuroblastos siguen la RMR a una velocidad de 70-80 $\mu\text{m/h}$ (Nam et al., 2007). El LCR baña los ventrículos laterales, como se ha explicado anteriormente y, al igual que los cambios en la composición del mismo modifican de forma bilateral la proliferación en la ZSV, también afectarán a los procesos de diferenciación de CMNs a CPNs (Lehtinen et al., 2011). Nuestros resultados muestran que, en efecto, la isquemia induce, a nivel agudo (24 horas), un incremento en esta *migración eutópica* que, además, se corresponde en el tiempo con la disminución temprana del número de células en proliferación en la ZSV. Estos resultados sugieren que, en esa fase aguda tras la isquemia, las células proliferativas de la ZSV reciben señales locales que promueven un aumento de migración, lo que induce su diferenciación a neuroblastos y su migración por la ruta predefinida en situación fisiológica. Este fenómeno, además, podría ser una explicación adicional a la disminución aparente del número de células en proliferación en la ZSV que observamos a los tiempos más tempranos. En nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de este aumento de la migración eutópica tras un proceso isquémico.

A los 2 días de la isquemia, tanto la migración eutópica como la proliferación en la ZSV vuelven a su nivel basal, iniciándose, como ha sido descrito en la bibliografía, la *migración ectópica* de los neuroblastos hacia el área isquémica cerebral (Ohab and Carmichael, 2008; Thored et al., 2006; Yamashita et al., 2006).

El análisis de la migración de los progenitores desde la ZSV al daño a través del cuerpo calloso, denominado en adelante *zona rostral*, demostró que existe una migración ectópica de los mismos activada por la isquemia: en Z2 (cuerpo calloso), existe una mayor migración en el hemisferio ipsilateral comparado con el contralateral a los 7 días tras isquemia mientras que, a los 28 días, los neuroblastos han alcanzado distancias mayores llegando a la zonas más cercana al daño, Z3, en el hemisferio ipsilateral, tanto comparado con su contralateral como con los niveles basales de un animal no isquémico. En Z1 no se observan variaciones debido posiblemente al elevado número de neuroblastos generados, lo que no permite detectar pequeños cambios, mientras que en las zonas Z2 y Z3 estas variaciones sí pueden ser percibidas.

Por otra parte, el análisis de la migración ectópica de neuroblastos en la *zona caudal* muestra cambios más significativos que los obtenidos en el estudio de la migración en la zona rostral comparando tiempos similares. En este área, a los 14 días ya existen diferencias significativas en la migración en el hemisferio ipsilateral comparado con los niveles de animales no isquémicos, mientras que a dicho tiempo no observábamos diferencias en la migración en la *zona rostral* en Z3. Además, se puede observar la unilateralidad del proceso desde el día 7, mientras que en el área rostral únicamente se observaba al tiempo más tardío estudiado, 28 días. Esto es debido, posiblemente, a que la distancia recorrida por los neuroblastos para alcanzar la zona peri-infarto es menor en este área. Para producirse una migración ectópica es necesaria una remodelación de los soportes utilizados por los neuroblastos para migrar, como son los vasos sanguíneos o el tubo glial. De hecho, se ha demostrado que la isquemia induce en la corteza ipsilateral un aumento en la expresión de moléculas que modifican estos soportes, como son VEGF y BDNF (Bagley and Belluscio, 2010; Sun et al., 2003). Una menor distancia significa menos dificultades para alcanzar la corteza dañada, lo que justifica los resultados obtenidos.

A diferencia de la proliferación en la ZSV, demostrada como bilateral a los distintos tiempos estudiados, la migración ha demostrado ser unilateral a todos ellos.

Esto apoya la idea de que, mientras que las variaciones en la composición del LCR son capaces de inducir cambios en la proliferación en la ZSV así como en la migración en la RMR en fase aguda (24 horas), las señales producidas por el área infartada y peri-infartada inducen la migración ectópica de los neuroblastos, de forma más importante en la zona ipsilesional. De hecho, como se comentará más adelante, el estudio realizado en el bloque III acerca de la liberación de moléculas quimioatrayentes en la corteza peri-infarto demuestra que la isquemia induce la expresión de moléculas implicadas en un incremento en la migración de neuroblastos así como en un cambio de rumbo de los mismos (potenciación de la migración ectópica).

Diferenciación neuronal en la corteza peri-infarto

Los resultados obtenidos indican que las células que proliferan durante la primera semana tras isquemia (*protocolo 1 de BrdU*), a pesar de diferenciarse con éxito a neuroblastos y alcanzar la corteza isquémica, las nuevas neuronas integradas en la corteza a los 7 y 14 días no consiguen sobrevivir a largo plazo, no encontrando una diferenciación significativa a los 28 días. Esto puede ser debido a que el entorno isquémico a dicho tiempo es aún hostil debido a los procesos inflamatorios activados en la cascada isquémica desencadenada tras el daño cerebral, impidiendo la finalización del proceso de integración (Li et al., 2015). De hecho, el elevado número de células BrdU⁺ en la corteza peri-infarto demuestra, por un lado, un activo proceso inflamatorio que se manifiesta como una proliferación local de células principalmente gliales, que se observa como microglía activada (Patel et al., 2013) y astrocitos reactivos (Ding, 2014) así como la plausible incorporación de BrdU a células en proceso de degeneración (Kuan et al., 2004).

Aunque el posible beneficio funcional directo de esta limitada neurogénesis es dudoso, es posible que los neuroblastos que llegan a la zona lesionada contribuyan a la recuperación funcional mediante el aporte de factores tróficos y/u otras sustancias que ayuden al resto de células presentes a resolver el conflicto en el que se encuentran.

Por otro lado, el análisis del número de células diferenciadas a los 65 días, empleando el *protocolo 2 de BrdU*, marca las células que proliferan en la ZSV en el pico de proliferación descrito tras isquemia, a 14 días (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001), y verificado en este estudio. Así, hemos puesto de manifiesto un aumento notable en el número de nuevas neuronas integradas en la corteza a los 65 días comparado con su

correspondiente *sham*, lo que demuestra que la isquemia cerebral, al menos en nuestro modelo, induce una neurogénesis efectiva que se traduce en la aparición de nuevas neuronas en la corteza ipsilesional. El *ratio* de nuevas neuronas generadas respecto al total de células marcadas que llegan a la corteza, es de 20%, correspondiente al descrito en la bibliografía (Rolls et al., 2007), tanto para el caso de los animales *sham* como para los animales con isquemia cerebral inducida, lo que sugiere que la isquemia cerebral, al menos en nuestro modelo, no produce cambios en el porcentaje de células destinadas a convertirse en nuevas neuronas, sino que es el incremento de su proliferación y/o migración lo que lleva a un aumento de nuevas neuronas en la corteza peri-infarto. Además, a estos tiempos, la inflamación ya se habrá resuelto en su mayor parte (Jin et al., 2010), lo que sugiere la existencia de un entorno más “benévolo” para la integración de las nuevas neuronas. En efecto, siguiendo este protocolo, el número total de células BrdU⁺/NeuN⁺ en la corteza peri-infarto a los 65 días es significativamente superior comparado con su correspondiente *sham* indicando una mayor supervivencia en dicho entorno.

Por tanto, los resultados obtenidos en este primer bloque demuestran que en nuestro modelo de isquemia experimental focal se inducen cambios a lo largo del tiempo en las tres etapas de la neurogénesis en la ZSV: proliferación, migración y diferenciación neuronal. La isquemia produce, en su fase aguda, una disminución del número de células proliferando en la ZSV a la par que un aumento del número de neuroblastos migrando de forma eutópica a través de la RMR, siendo estos cambios posiblemente debidos a modificaciones en la composición del LCR. Tras esa fase inicial, tanto la proliferación en la ZSV como la migración de neuroblastos a través de su ruta fisiológica vuelven a sus niveles basales, comenzando una migración ectópica y unilateral de neuroblastos hacia la corteza dañada. Los neuroblastos que migran en la zona rostral del cerebro tardarán más tiempo en alcanzar la corteza dañada que aquellos presentes en la zona caudal, debido a la distancia necesaria que deben recorrer. El aumento de células proliferando en la ZSV a los 14 días tras la isquemia conlleva el incremento en el número de progenitores a los 28 días llevando, en última instancia, a la aparición de un número significativo de neuronas diferenciadas en la corteza peri-infarto a los 65 días del daño cerebral.

BLOQUE II: Papel de TLR4 en procesos de neuroreparación en la ZSV tras una isquemia cerebral experimental

Como se ha explicado previamente, la neuroinflamación, iniciada por activación de la inmunidad innata, va a estar implicada, por un lado, en el daño cerebral producido en la fase aguda de un ictus y, por otro, en procesos de neuroreparación que se iniciarán en la fase subaguda y continuarán en la fase crónica de la enfermedad. Uno de los receptores implicados en inmunidad innata cuyos estudios previos, incluidos los de nuestro laboratorio, parecen indicar su posible papel dual, en daño y en neuroreparación, es el TLR4. Por ello, en el **Bloque II** de esta Tesis Doctoral se ha explorado el papel de dicho receptor en las distintas etapas de la neurogénesis tras una isquemia experimental cortical.

Efecto de TLR4 en la evolución del tamaño de infarto tras isquemia

Debido a que 1) la proliferación en la ZSV es dependiente del volumen de infarto (Moraga et al., 2014) y 2) la ausencia de TLR4 produce neuroprotección en la fase aguda de una isquemia experimental (Caso et al., 2007), para proceder a los estudios de proliferación sin sesgos por diferencias en el tamaño de la lesión se compararon dos grupos experimentales con tamaño de infarto similar, obtenidos mediante una oclusión de la ACM, distal en los animales TLR4^{+/+} y proximal en los animales TLR4^{-/-}. Coincidiendo con resultados publicados (Moraga et al., 2014), estos animales presentan un tamaño de infarto similar a las 24 horas y 7 días tras la isquemia. Sin embargo, a los 14 días, tiempo al que la lesión se mide como pérdida de corteza, dicha pérdida fue mayor en el caso de los animales deficientes en el receptor. Una explicación a este dato podría radicar en observaciones previas de nuestro grupo: curiosamente, los animales TLR4^{-/-} presentan una mayor microgliosis cortical a los 14 días tras la isquemia experimental comparado con los animales TLR4^{+/+} (Tesis Doctoral, Moraga, A. 2014); este hecho podría deberse a que los animales TLR4^{-/-}, al mostrar una respuesta inflamatoria inicial disminuida, podrían también experimentar un descenso en los procesos de resolución de ésta, dato apoyado por estudios previos (Yang et al., 2012), lo que implicaría un daño inflamatorio pobremente resuelto, sostenido en el tiempo, que alteraría el sino final de estos animales a tiempos más largos. Otras posibles explicaciones serían la existencia de un menor proceso neurogénico en la zona de penumbra por la deficiencia en TLR4, evento también descrito (Moraga et al., 2014), y/o

una menor llegada de progenitores a la misma, con el consiguiente descenso en posibles factores tróficos que ayudarían a la supervivencia del tejido cuya viabilidad está comprometida. En cualquier caso, son necesarios más estudios para sustanciar este hallazgo.

Resultados previos, incluidos algunos de nuestro grupo de investigación, han descrito la implicación de TLR4 en neurogénesis a distintos niveles (Lei et al., 2016; Moraga et al., 2014; Rolls et al., 2007); sin embargo, los mecanismos implicados, así como las variaciones temporales de estos cambios, aún no han sido dilucidados. En un intento de aportar cierta luz sobre estos procesos tras isquemia, los estudios realizados en la parte restante de esta Tesis Doctoral se han centrado en el estudio del papel de TLR4 en la **proliferación** en la ZSV y en la **migración** de neuroblastos, ambos tras una isquemia cortical.

Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV y migración eutópica de neuroblastos en condiciones basales

La comparación entre animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} demostró que, en condiciones basales, existe una mayor proliferación en la ZSV en los ratones deficientes en el receptor. Nuestros datos corroboran resultados previamente publicados demostrando que la ausencia de TLR4 en condiciones fisiológicas induce una mayor proliferación del conjunto de células presentes en la ZSV y en el GD (Rolls et al., 2007). Asimismo, en estas condiciones basales, la deficiencia en TLR4 está asociada a un incremento de la migración de neuroblastos por su ruta predefinida, lo que se correlaciona con la mayor proliferación basal en la ZSV en dichos animales. Además, en base a los resultados publicados que demuestran un mayor número de pre-neuroblastos o células de *tipo C* tardías en animales TLR4^{-/-} en condiciones basales (Moraga et al., 2014), es de esperar que exista una mayor diferenciación a neuroblastos en esos animales.

Por otro lado, el análisis específico del conjunto de **poblaciones neurales** presentes en la ZSV (**Figura 5.1**) demuestra que, en ausencia de daño cerebral, no existen diferencias dependientes de TLR4: i) en el total de CMNs y CPNs presentes en la ZSV (células prominina-1⁺), ii) en las células tipo B quiescentes (células prominina-1⁺-EGFR⁻) y iii) en aquellas en estado proliferativo (células prominina-1⁺-EGFR⁺), tanto de tipo B activadas (Prominina-1⁺-EGFR⁺-GFAP⁺) como de tipo C (Prominina-1⁺-EGFR⁺-Mash-1⁺). El hecho de no observar la misma tendencia en la cuantificación de células

Ki67⁺ (mayor en ratones deficientes de TLR4) y en la de células prominina-1⁺-EGFR⁺ (no existen diferencias entre ambos fenotipos) podría ser debido a que, mediante el análisis de expresión de Ki67, se obtiene el conjunto todos los posibles tipos celulares que se encuentran proliferando en la ZSV, y que teóricamente incluyen además de CMNs, CPNs proliferativas, células ependimales proliferativas, astrocitos reactivos y microglía activada mientras que, en la cuantificación de células prominina-1⁺-EGFR⁺, únicamente obtenemos información de las CMNs, CPNs, y ependimales proliferativas.

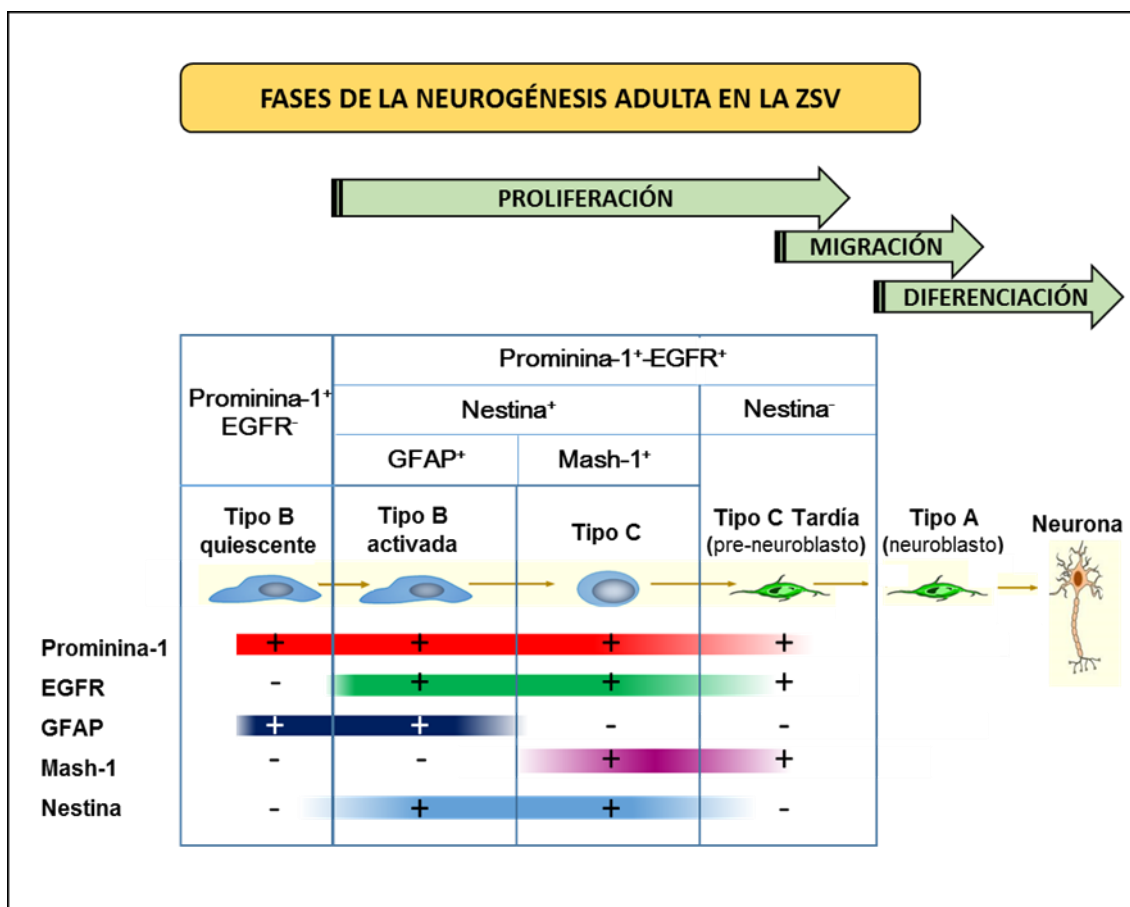


Figura 5.1. Esquema de los principales tipos celulares y marcadores utilizados para su caracterización (Codega et al., 2014; Ming and Song, 2011; Pastrana et al., 2009; Walker et al., 2013).

Efecto de TLR4 en la proliferación en la ZSV y migración eutópica de neuroblastos en la fase aguda de una isquemia experimental

Nuestros resultados demuestran, corroborando los obtenidos en el **bloque I**, que el efecto de la isquemia en el estado proliferativo de las células presentes en la ZSV, es bilateral y, además, que esta bilateralidad es independiente de TLR4. Así, los animales,

tanto TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-} siguen, en líneas generales, un patrón de proliferación similar: tras una disminución del número de células en proliferación en la fase aguda tras la isquemia (24 horas después del daño), se vuelven a recobrar los niveles basales a tiempos posteriores (7 y 14 días tras el daño). En fase aguda de la isquemia experimental, nuestros resultados demuestran, mediante dos técnicas distintas (citometría de flujo e inmunohistoquímica), un menor número de células en proliferación en la ZSV tanto en animales TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-}, cuando se comparan con sus correspondientes basales. Este hecho podría deberse, como se ha explicado en el **bloque I**, a varios factores como son la composición del LCR, las modificaciones en su pH tras isquemia y/o los cambios en los procesos de migración temprana (Bakay et al., 1986; Mutch and Hansen, 1984). Es de destacar que, en este proceso de disminución de la proliferación, sí se observan diferencias entre cepas, como es la existencia de un mayor número de células proliferando en los animales TLR4^{+/+} frente a los TLR4^{-/-}. Curiosamente, este resultado es el contrario al obtenido en situaciones fisiológicas. Al igual que se ha comentado, diversas causas podrían subyacer a estos cambios. Por un lado, estudios de la composición de LCR y del pH de los animales de ambos fenotipos serían necesarios para saber si existen diferencias que justificaran la diferencia entre la presencia o ausencia de TLR4 en estos animales. Por otra parte, hemos de tener en cuenta que el número de células en proliferación presentes en la zona resulta del balance entre la tasa de proliferación y las tasas de migración y/o muerte que podrían tener lugar. De cualquier forma y con el objeto de entender este último resultado que, como hemos comentado, contradice aparentemente los resultados en la literatura que indican que la deficiencia en TLR4 en condiciones fisiológicas se asocia a una mayor proliferación en la ZSV (Rolls et al., 2007), realizamos estudios *in vitro* con CMNs obtenidas de la ZSV de animales TLR4^{+/+}. Nuestros resultados demuestran que la activación específica de CMNs con agonistas exógenos o endógenos de TLR4, como LPS o HMGB1, induce una mayor proliferación manifestada por un incremento en el tamaño medio de las neuroesferas y, en particular, en un aumento del porcentaje de neuroesferas de mayor tamaño, cuando se comparó con aquellas tratadas con LPSRS, un antagonista específico del receptor TLR4. Este resultado está de acuerdo con estudios previos publicados *in vitro* tras estímulo de CMNs entéricas con LPS (Schuster et al., 2014) o de CMNs embrionarias con el ligando endógeno HMGB1 (Wang et al., 2014), así como resultados *in vivo*, aunque en este caso indirectos (Hayakawa et al.,

2010), y sugiere una posible activación de TLR4, quizá por un ligando agonista presente en el LCR que baña los ventrículos. En definitiva, señales tempranas independientes de TLR4 inducen una caída de las células en proliferación en la ZSV tras la isquemia que, en el caso de los animales TLR4^{+/+}, se ve parcialmente compensada por un aumento de la tasa de proliferación de forma TLR4-dependiente, como demuestran los datos *in vitro*.

Para intentar comprender el resultado anterior de mayor proliferación a las 24 horas en los animales TLR4^{+/+}, nuestros resultados muestran que, en la fase aguda de una isquemia experimental, los animales TLR4^{+/+} incrementan su migración rostral a las 24 horas de la isquemia retornando a niveles basales a las 48 horas, mientras que los animales TLR4^{-/-} no ven modificaciones en su ruta a los dos tiempos estudiados. Ello descarta que el menor número de células en proliferación presentes en la ZSV de los animales TLR4^{-/-} se deba a una mayor migración. Al contrario, y corroborando los resultados obtenidos en el **bloque I** así como los datos *in vitro*, nuestros resultados demuestran que TLR4 está implicado en un incremento transitorio de la migración de neuroblastos por su ruta predefinida, 24 horas tras isquemia, incremento asociado a la disminución del número de células en proliferación en la ZSV observada a dicho tiempo. El incremento de la migración, y la disminución de la proliferación, parece indicar que las señales pro-migratorias predominan frente a las señales que potencian la proliferación a este tiempo agudo, aunque serían necesarios experimentos futuros para discutir este aspecto. En el caso de los animales deficientes en TLR4, pese a que observamos una disminución mayor del número de células proliferando 24 horas tras isquemia, no se correlaciona en el tiempo con un aumento significativo de la migración eutópica rostral, ni a 24 ni a 48 horas tras la cirugía. Estudios previos de la migración ectópica de neuroblastos al área dañada demostraron que la deficiencia en TLR4 provoca un retraso en dicha migración (Moraga et al., 2014), por lo que es posible que en este caso la migración a través de la RMR sea también más tardía, o bien que no se produzca debido a la falta de señales migratorias necesarias. Estos datos parecen indicar que, en condiciones basales, TLR4 regula a la baja la proliferación que se traduce en una menor migración de los neuroblastos a través de su ruta predefinida, mientras que, en la fase aguda de una isquemia, TLR4 es necesario para facilitar el incremento transitorio de la migración de neuroblastos a través de la misma.

Cuando analizamos las poblaciones neurales de la ZSV en la fase aguda tras isquemia, aunque tampoco se registran variaciones ni en el total de CMNs y CPNs

(células prominina-1⁺), ni en las células tipo B quiescente (células prominina-1⁺-EGFR⁻), sí que observamos una disminución del porcentaje de células neurales totales en estado proliferativo (células prominina-1⁺-EGFR⁺) tanto en los animales TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-}, de acuerdo con los valores totales de células Ki67⁺. Pero además, analizando las subpoblaciones en esta fase aguda, se observa, en primer lugar, un porcentaje superior de células de tipo B activadas (prominina-1⁺-EGFR⁺-GFAP⁺) en los animales TLR4^{+/+} que en los animales TLR4^{-/-}; lo que sugiere que este tipo celular podría ser la diana de TLR4 en sus efectos proliferativos. Por otro lado, en lo que respecta a las células de tipo C (prominina-1⁺-EGFR⁺-Mash-1⁺), en los animales isquémicos TLR4^{+/+} se aprecia una disminución de su porcentaje respecto a su basal, disminución que, en el caso de los animales TLR4^{-/-}, no se observa. Estos efectos podrían justificarse en los animales TLR4^{+/+} por un aumento de su migración TLR4-dependiente y, en los TLR4^{-/-}, por un aumento de su retención al no migrar, o hacerlo en menor medida. En otras palabras, la isquemia induciría en los ratones TLR4^{+/+} una disminución de las células de tipo C comparado con la situación basal, células que se habrán diferenciado a neuroblastos (en concordancia con el incremento de neuroblastos que se observan en la RMR), mientras que en los animales deficientes en TLR4 no se modifica su porcentaje tras isquemia.

Datos previos publicados por nuestro grupo de investigación (Moraga et al., 2014), al estudiar conjuntamente la población formada por células de tipo B activadas y células de tipo C (prominina-1⁺/EGFR⁺/nestina⁺) presentes en la ZSV, no mostraron cambios ni por la isquemia ni por la presencia de TLR4 24 horas tras la oclusión. Sin embargo, sí se apreció un mayor número de células de tipo C tardías o pre-neuroblastos (células prominina-1⁺/EGFR⁺/nestina⁻) en los animales TLR4^{-/-} tanto en condiciones basales como 24 horas tras la lesión isquémica. Esta población también expresa el marcador celular Mash-1, por lo que se encuentra incluida en nuestra población prominina-1⁺/EGFR⁺/Mash-1⁺, donde su contribución en este dato será del 15% (Ponti et al., 2013). Para conciliar aquellos datos con los presentes, hemos de tener en cuenta que, en esta Tesis Doctoral, hemos analizado por separado:

a) el total de CMNs quiescentes (prominina-1⁺-EGFR⁻), donde se englobarían las células de tipo B quiescentes, pero también las células de tipo E o ependimales; como decíamos, su estudio muestra que el conjunto de estas dos subpoblaciones no se ve

modificado debido a la isquemia ni es dependientes de TLR4. El estudio por separado de ambas poblaciones podría proporcionar más información al respecto.

b) las CMNs y CPNs proliferativas (prominina-1⁺-EGFR⁺), que incluyen células de tipo B activadas, células de tipo C y células de tipo C tardías; es este caso, nuestros resultados apoyan lo obtenido en el estudio previo con Ki67, que es una disminución de la proliferación en la fase aguda de la isquemia (24 horas tras la oclusión). Sin embargo, mientras que, en condiciones basales, se observa un mayor número de células Ki67⁺ en la ZSV del animal TLR4^{-/-}, no vemos diferencias dependientes de TLR4 cuando determinamos el número de células prominina-1⁺-EGFR⁺. Esto parece indicar que al menos parte de células que se encuentran proliferando en los animales TLR4^{-/-} en condiciones basales podrían ser poblaciones no neurales proliferativas, como microglía activada o astrocitos reactivos. No existen datos en la literatura al respecto; serán por tanto necesarios experimentos adicionales para esclarecer este punto.

c) las distintas subpoblaciones que se engloban dentro de la población prominina-1⁺/EGFR⁺/nestina⁺, que son células de tipo B activadas y células de tipo C (Figura 5.1) son posiblemente las de mayor interés para nuestro trabajo. En este caso, como hemos comentado más arriba, demostramos que, tras isquemia, los animales TLR4^{-/-} comparados con los TLR4^{+/+} presentan un menor porcentaje de células de tipo B activadas, en concordancia con los ensayos *in vitro* donde demostramos un aumento de proliferación por estímulo con agonistas TLR4 de neuroesferas que, según trabajos previos, derivan precisamente de células de tipo B activadas (Doetsch et al., 1999). El menor porcentaje de células de tipo B activadas, la ausencia de cambios en las células de tipo C, así como el mayor número de células de tipo C tardías, que estarían incluidas en la población anterior (Moraga et al., 2014) parece indicar que, aunque hay diferenciación de CMNs a CPNs, el aumento de neuroblastos en su fase no diferenciada (células de tipo C tardías o pre-neuroblastos) en la ZSV en ausencia de TLR4 se debe a una retención de éstos en esta localización, más que a un efecto proliferativo. Esta acumulación podría ser debida a la falta de señales necesarias para diferenciarse a progenitores neurales y que son necesarias para comenzar los procesos de migración hacia el área isquémica, dato que corroboraría el retraso de la migración de neuroblastos al área dañada en los animales deficientes en TLR4, publicado por nuestro grupo previamente (Moraga et al., 2014).

Esta parte de nuestros resultados muestra que TLR4 es necesario para el mantenimiento de un porcentaje de células de tipo B activadas elevado tras isquemia, así como para la diferenciación efectiva de células de tipo C a neuroblastos.

Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV en la fase crónica de una isquemia experimental

Finalmente, el análisis de los estudios *in vivo* durante la fase crónica de la isquemia demuestra que, tras la disminución observada a las 24 horas, a los 7 y 14 días, el número de células Ki67⁺ en la ZSV en los dos grupos experimentales con tamaño de infarto similar se recupera a los niveles basales. Es interesante el hecho de que, en el caso del grupo de oclusión proximal en animales TLR4^{+/+}, que presentaba un infarto significativamente superior al de los dos grupos analizados previamente, sí observamos un incremento de células proliferando a los 7 días respecto a los basales. Estos datos corroboran los incrementos de proliferación observados entre los días 7 y 14 tras una isquemia (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2004), y están de acuerdo con los datos publicados previamente por nuestro grupo en el que se demuestra que la proliferación es dependiente del volumen de infarto (Moraga et al., 2014). La comparación entre animales TLR4^{+/+} y TLR4^{-/-} demostró, de manera similar a los niveles basales, la presencia de un mayor número de células en proliferación en la ZSV en los animales TLR4^{-/-}, dato consistente con lo previamente publicado (Moraga et al., 2014).

En cuanto a la recuperación de los niveles de proliferación a tiempos posteriores, nuestros resultados no discriminan si se tratan de un aumento activo del proceso de proliferación y/o de una mera desaparición de aquellos fenómenos que inducen la disminución temprana. Aunque el efecto proliferativo de los agonistas de TLR4 que hemos observado *in vitro* podría explicar el incremento de proliferación que se produce de 24 horas a 7 días tras isquemia en animales TLR4^{+/+}, sin embargo, como muestran los animales TLR4^{-/-}, este evento parece ser, al menos en parte, independiente de TLR4. En este sentido, es interesante que una buena parte de los estudios que relacionan HMGB1 con estudios de proliferación aseguran que dicho ligando no sólo se une a TLR4, sino que induce cambios en la proliferación mediados por la familia de receptores RAGE (Sorci et al., 2013), por lo que podría actuar sobre los animales deficientes en TLR4 provocando el efecto que observamos. De nuevo, son necesarios estudios adicionales para esclarecer este punto.

Efecto de TLR4 sobre la expresión de moléculas implicadas en neurogénesis en la corteza peri-infarto

El análisis de la expresión en la corteza peri-infarto de moléculas posiblemente implicadas en la migración de neuroblastos dio lugar a resultados diferentes en función del mediador estudiado. El aumento de expresión de IL-6 y MCP-1 producido por la isquemia revierte antes en los animales TLR4^{+/+} comparado con los TLR4^{-/-}. SDF-1 α , por otro lado, alcanza su máximo de expresión a los 3 días en los animales TLR4^{+/+}, mientras que, en los animales TLR4^{-/-} este mismo incremento se observa a los 7 días. BDNF disminuye su expresión de manera similar en los animales de ambos fenotipos, con recuperación a los 7 días únicamente en los ratones TLR4^{+/+}. No se encontraron diferencias en la expresión de VEGF-A ni a los distintos tiempos ni dependientes de TLR4. Finalmente, aunque se observó un incremento de IL-1 β y MMP-9 a los 3 días tras isquemia en los animales tanto TLR4^{+/+} como TLR4^{-/-}, en el caso de MMP-9 no encontramos diferencias dependientes del fenotipo mientras que, respecto a IL-1 β , la expresión resultó mayor en los animales deficientes en el receptor.

Como se ha explicado anteriormente, ante una patología cerebral como es un daño isquémico, existe un re-direccionamiento de los progenitores neurales al área dañada (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001), evento denominado migración ectópica. Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que, tras una isquemia experimental, los ratones deficientes en TLR4 presentan un retraso en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área de daño isquémico (Moraga et al., 2014). Este hecho, junto a la evidencia de que los neuroblastos no expresan TLR4 (Hassan et al., 2006; Moraga et al., 2014), implica que los cambios que se producen en la migración de los neuroblastos deberán ser debidos a modificaciones, bien en las etapas anteriores de proliferación, sobre las poblaciones que sí expresan este receptor (Rolls et al., 2007; Ye et al., 2014), o bien a un efecto indirecto sobre estas poblaciones, debido a la liberación de moléculas por parte de células implicadas en los procesos de migración que expresan TLR4, como son las células endoteliales (Dauphinee and Karsan, 2006), los astrocitos (Gorina et al., 2011), las neuronas (Leow-Dyke et al., 2012; Wang et al., 2013) o la microglía (Yao et al., 2013).

Con motivo de comprender este retraso de la migración ectópica debido a la deficiencia en TLR4, hemos indagado en los posibles mecanismos moleculares implicados, centrándonos en el papel que juegan las células de la corteza peri-infarto en este proceso. La demostración de que IL-6 y MCP-1 tardan menos en recuperar sus niveles basales tras isquemia en los animales TLR4^{+/+} parece indicar que TLR4 está implicado en resolución más temprana de la inflamación. Asimismo, estudios previos han demostrado que, tras un daño cerebral, MCP-1 proporciona señales quimiotácticas que redirigen a los neuroblastos a la zona de daño (Yan et al., 2007) por lo que, además, el incremento de expresión más temprano de dicha molécula en los animales TLR4^{+/+} podría estar vinculado al retraso de la migración ectópica descrito en los animales deficientes en el receptor. Por otro lado, es bien sabido que, tras un daño cerebral, se produce inicialmente un proceso inflamatorio seguido, tras su resolución, de procesos de neuroreparación. Por ello, en el análisis de SDF-1 α , cuya participación en el eje SDF-1 α -CXCR4 se ha implicado directamente en el reclutamiento de neuroblastos (Imitola et al., 2004; Robin et al., 2006; Thored et al., 2006), el hecho de que en los animales TLR4^{-/-} el incremento de expresión sea más tardío podría ser debido a la tardía resolución de la inflamación en esos animales. Respecto a BDNF, factor implicado directamente en la migración de neuroblastos (Bagley and Belluscio, 2010), observamos de nuevo una recuperación de sus niveles más tardío en los animales TLR4^{-/-}. Además, el hecho de que SDF-1 α promueve, a través de CXCR4, la sobreexpresión de BDNF (Kahle and Bix, 2013), se correlaciona con los cambios expresión en el tiempo de ambas moléculas. Finalmente, hemos demostrado que IL-1 β presenta una mayor expresión a los 3 días en los animales deficientes en el receptor. Esto, relacionado con que el bloqueo de su receptor tras un ictus isquémico potencia la migración ectópica de neuroblastos (Pradillo et al., 2016), parece indicar también su implicación en el retraso en la migración explicado anteriormente.

En definitiva, estos resultados parecen indicar que la deficiencia en TLR4 está implicada en una resolución de la inflamación más tardía en el área circundante al daño así como (o debido a ello) a un retraso de la expresión de moléculas implicadas en la potenciación de la migración de los neuroblastos al área dañada.

Efecto de la modulación farmacológica de TLR4 en la expresión de moléculas implicadas en neurogénesis en cultivo de astrocitos.

Tras un daño isquémico, el cese de oxígeno y nutrientes a la parte del cerebro irrigada por la arteria en cuestión va a afectar, en mayor o menor grado, a todas las células presentes en la unidad neurovascular. La liberación de DAMPs por parte de las células del área isquémica va a tener como objetivo los receptores que se encuentran en las células que la rodean, que se activarán y liberarán moléculas quimio-atrayentes y otras moléculas moduladoras de la migración que permitan dirigir la migración de neuroblastos hacia las regiones dañadas por la isquemia (Kahle and Bix, 2013). En este estudio, nos hemos centrado en el papel del TLR4 de los astrocitos en la diferenciación de CMNs y en la movilización de los neuroblastos.

Los resultados obtenidos han demostrado que la activación específica de TLR4 por LPS en astrocitos induce la expresión de moléculas, tanto de manera temprana (IL-6, MCP-1, SDF-1 α , IL-1 β y MMP-9) como tardía (BDNF), que podrían participar en los procesos de migración. Estos resultados apoyan la idea de que TLR4 tiene un importante papel como modulador positivo en la migración. Aunque el papel de SDF-1 α , IL-1 β , MMP-9 y BDNF en la neurogénesis está más estudiado debido a las evidencias comentadas en el apartado anterior, existen también algunos estudios que han demostrado la implicación de IL-6, molécula fundamentalmente asociada a inflamación, en un incremento de la proliferación de CMNs y potenciación de la diferenciación neuronal (Meng et al., 2015). Su participación en la etapa de migración de neuroblastos, sin embargo, no está claramente definida, por lo que serían necesarias estrategias adicionales para comprobar su efecto sobre la migración mediante ensayos *in vitro* que incluyeran CMNs en el compartimento superior e IL-6 en el compartimento inferior. Por otro lado, el aumento observado de la expresión de MMP-9, aunque probablemente no influya en la migración de neuroblastos en un ensayo de migración *in vitro* debido a la estructura de los insertos, sí que sería necesaria funcionalmente *in vivo* para facilitar el paso de los astrocitos hacia las regiones dañadas por la isquemia mediante la degradación de proteínas de la matriz extracelular (Barkho et al., 2008).

Efecto de la activación de TLR4 sobre la migración de neuroblastos *in vitro*

Tras una isquemia, las células afectadas liberan DAMPs que van a difundir, entre otros compartimentos, al parénquima dañado, actuando sobre receptores de las células circundantes al daño, y al LCR, actuando, entre otros sitios, sobre las células presentes en la ZSV. Para estudiar el efecto que tendría la modificación en la composición de los

dos compartimentos (LCR y corteza) en la migración de neuroblastos, hemos utilizado un abordaje metodológico consistente en ensayos de migración *in vitro* que permiten discriminar el efecto directo (sobre las CMNs de la ZSV), indirecto (sobre los astrocitos) o total (sobre los dos tipos celulares) de la modulación farmacológica de TLR4.

En este estudio hemos demostrado que las CMNs aisladas de ZSV necesitan, *in vitro*, la presencia de MCA, es decir, un entorno similar al que se encuentran en el organismo, tanto para poder migrar, dato reforzado por estudios publicados (Bravo-Ferrer et al., 2017), como para responder ante estímulos como, en este caso, la activación de TLR4 mediante el PAMP específico LPS. La activación específica con LPS del TLR4 de las CMNs (efecto directo) está implicada, de manera directa, en la diferenciación de CMNs a neuroblastos y en un incremento de la capacidad de migración de los mismos en un entorno adecuado (en presencia de un soporte de migración y en ausencia de señales proliferativas). La activación específica del TLR4 de los astrocitos (efecto indirecto), a pesar de que hemos descrito previamente un aumento de la expresión de moléculas quimiotrayentes, no induce un incremento en la migración de los neuroblastos. Esto, junto con el hecho de que en el efecto total (en el cual tanto CMNs como astrocitos expresan TLR4) tampoco se observan cambios en la migración, sugería la posible toxicidad del tratamiento, a pesar de haber empleado una dosis ampliamente utilizada en la literatura. En efecto, en las condiciones de nuestro ensayo, LPS produce un incremento de iNOS y COX-2, moléculas que promueven la apoptosis, dato corroborado por estudios previos (Font-Nieves et al., 2012; Saha and Pahan, 2006) y una mayor liberación de LDH en los cocultivos tratados con dicho agonista. Debido a esto, sería importante rehacer estos experimentos con dosis menores de LPS para analizar los efectos indirectos y totales de la activación específica de TLR4 sobre la migración de neuroblastos.

No obstante, el estudio del efecto directo del DAMP HMGB1, quizás más relevante fisiológicamente que el LPS, sí muestra, de manera preliminar, que la actuación de este DAMP a través de alguno de sus receptores (TLR4, TLR2 o familia de receptores RAGE) presentes en la propia CMN induce su diferenciación a neuroblastos e impulsa su migración. Estudios previos han demostrado que el bloqueo de receptores RAGE inhibe la migración neural (Chou et al., 2004), por lo que el ligando podría adicionalmente actuar por esta vía, sin descartar la de TLR4. Es importante destacar que ha sido descrito un incremento de la concentración de HMGB1 en LCR

tras daño cerebral isquémico (Qiu et al., 2008), por lo que este ligando podría llegar a la ZSV a través de esa vía y actuar sobre las CMNs, ejerciendo un efecto directo sobre las mismas. En efecto, en el estudio del efecto de HMGB1 sobre los astrocitos (efecto indirecto) demostramos que esta molécula induce un aumento de la migración de los neuroblastos, lo que podría suceder *in vivo* por su descrita liberación en la zona periinfarto a tiempos agudos tras isquemia (Qiu et al., 2008). Sin embargo, debido a su posible unión a otros receptores, el incremento en la migración de neuroblastos, podría ser mediado, además de por la activación de TLR4 astrocitario, por i) la activación de TLR2 y/o de receptores RAGE de los astrocitos, o ii) por las propias CMNs a través de RAGE o TLR4 (ya que estas células en el estudio del efecto indirecto no expresan TLR4). Para determinar si este incremento se produce vía astrocitos, se realizó la cuantificación de moléculas quimiotrayentes debido al tratamiento con HMGB1, que mostraron cambios únicamente en la IL-6. Esto podría indicar, bien que HMGB1 no influye en la migración de los neuroblastos a través de moléculas liberadas por los astrocitos, que sí influya a este tiempo y lo haga a través de la IL-6, con un posible papel modulador de la migración de neuroblastos (Meng et al., 2015), cuya expresión mediada por HMGB1 ha sido analizada en modelos de isquemia *in vivo* (Wu et al., 2010), o en otros tipos celulares (Nativel et al., 2013)), o bien que sí que influya a través de otros mediadores que no han sido detectados con nuestro diseño experimental. Ha sido descrito que HMGB1 promueve la sobreexpresión de MMP-9 a través de TLR4 en astrocitos *in vitro* (Qiu et al., 2010), lo que apoya el interés de elegir nuevos tiempos de análisis de la expresión de moléculas implicadas en migración. Respecto al efecto total de HMGB1 sobre, tanto CMNs como sobre astrocitos, ambos expresando TLR4, se demostró de nuevo un incremento de la migración de neuroblastos, que sería debido a la suma de los dos efectos anteriores.

Aunque es de gran interés conocer sobre qué células actúan los DAMPs y qué efecto tiene sobre las mismas en la migración de neuroblastos, es también de gran importancia conocer exactamente a través de qué receptor se producen estos efectos, para poder utilizarlos como dianas terapéuticas futuras para su posible utilización potenciando esta etapa de la neurogénesis. Para ello, son necesarios futuros ensayos *in vitro*. Además, aunque el diseño experimental *in vitro* llevado a cabo se basa exclusivamente en el papel que tendrían los astrocitos presentes en la corteza en la migración de neuroblastos, sería también de gran importancia estudiar la implicación de

la microglía en este proceso, que viene apoyada por numerosas evidencias (Aarum et al., 2003; Lopes et al., 2016; Marshall et al., 2014; Ribeiro Xavier et al., 2015).

En resumen, los estudios que hemos realizado demuestran que:

En situación basal, los resultados *in vivo* muestran que TLR4 frena la proliferación, lo que se traduce en una menor migración eutópica. La ausencia de dicho freno en los animales TLR4^{-/-} se traduce en una mayor proliferación del conjunto de células presentes en la ZSV, lo que repercute en una mayor migración de neuroblastos por su ruta predefinida.

En la fase aguda tras la isquemia, sin embargo, el número de células en proliferación disminuye de manera significativa en los animales de ambos fenotipos seguramente por señales tempranas independientes de TLR4 como modificaciones en el pH del LCR. En el caso de los animales TLR4^{+/+} esta caída inicial se ve parcialmente compensada por un aumento de la tasa de proliferación TLR4-dependiente, como demuestran los datos tanto *in vivo* como *in vitro*. Asimismo, los experimentos realizados para caracterizar las poblaciones neurales de la ZSV, sugieren que los efectos activadores de TLR4 se ejercen sobre las células de tipo B activadas tras isquemia, datos confirmados por los estudios *in vitro* de activación de CMNs por LPS y HMGB1.

Por otro lado, los resultados de migración eutópica demuestran que TLR4, en la fase aguda de una isquemia, es necesario para facilitar el incremento transitorio de la migración de neuroblastos a través de la misma, lo que posiblemente explique la disminución de las células de tipo C respecto a su basal. En cuanto a los procesos de migración ectópica, nuestros resultados parecen indicar que la deficiencia en TLR4 conlleva una resolución de la inflamación más tardía en el área circundante al daño, así como en un retraso de la expresión de moléculas implicadas en la potenciación de la migración de los neuroblastos al área dañada. De hecho, los estudios *in vitro* realizados demuestran que la activación específica TLR4 por LPS en astrocitos induce la expresión de moléculas que podrían participar en estos procesos de migración. Asimismo, parece que, tanto la activación específica de TLR4 como por parte del DAMP HMGB1 sobre las CMNs de la ZSV induce una diferenciación de las mismas a neuroblastos potenciando su migración. Además, estos ligandos también son capaces de inducir la migración de neuroblastos a través de un efecto indirecto mediado por los astrocitos de la corteza.

Ambos resultados apoyan la idea de que TLR4 tiene un importante papel como modulador positivo en la migración

Finalmente, durante la fase crónica del ictus, al igual que sucede en condiciones fisiológicas, TLR4 ejerce un freno sobre la proliferación en la ZSV.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1. En la fase aguda de una isquemia cortical se produce una disminución bilateral de las células en proliferación en la ZSV y un incremento en la migración eutópica de neuroblastos a través de la RMR. Estos cambios se asocian, posiblemente, a modificaciones del LCR, como puede ser la acidosis.
2. Tras esa fase inicial y durante la fase crónica, se produce un incremento de la proliferación en la ZSV y una normalización de la migración eutópica de neuroblastos a sus niveles basales.
3. Asimismo, durante la fase crónica, e inducida por la isquemia, se inicia una migración ectópica unilateral de neuroblastos hacia la zona peri-infarto. Esta migración es más rápida en el área caudal del cerebro y más lenta en la zona rostral del mismo.
4. El incremento de la proliferación (que alcanza su máximo a los 14 días) conjuntamente con la potenciación de la migración ectópica conducen a un mayor número de progenitores neurales que alcanzan la corteza peri-infarto y que se integran como neuronas maduras.
5. En condiciones basales, así como en la fase crónica de un ictus, TLR4 frena la proliferación celular en la ZSV, lo que se manifiesta en una menor migración eutópica de los neuroblastos a través de su ruta predefinida (RMR).
6. Durante la fase aguda de una isquemia cerebral se produce una disminución bilateral del número de células en proliferación de la ZSV. TLR4 es necesario para el mantenimiento de un mayor número de células proliferativas de la ZSV. Los efectos activadores de la proliferación se ejercen fundamentalmente sobre las células de tipo B activadas posiblemente a través del estímulo de TLR4 por ligandos como LPS y HMGB1.
7. Asimismo, TLR4 está implicado en el mantenimiento y en el incremento transitorio de la migración eutópica de neuroblastos que se produce en la fase aguda tras ictus, lo que posiblemente explique la disminución del número de células de tipo C observada.

8. La activación específica *in vitro* del TLR4 de astrocitos por ligandos como LPS y HMGB1 induce la expresión de mediadores neurogénicos.
9. De acuerdo con ello, tras una isquemia *in vivo*, TLR4 es necesario para facilitar la migración ectópica de neuroblastos tras un proceso isquémico. La ausencia de TLR4 conlleva un retraso en la expresión de mediadores neurogénicos, y una resolución tardía de la inflamación en el área peri-infarto, llevando como consecuencia a un retraso en la migración ectópica de neuroblastos al área dañada.
10. En resumen, nuestros datos indican que tras una isquemia cortical se producen modificaciones a lo largo del tiempo de las principales etapas de la neurogénesis por lo que, actuando en el momento adecuado, se podría realizar una potenciación efectiva de dicho proceso que ayude a la mejora funcional del paciente. Además, nuestros datos indican que TLR4 es una prometedora diana para la modulación de la neurogénesis endógena tras un ictus.

7.- CONCLUSIONS

7.- CONCLUSIONS

1. In the acute phase of cortical ischemia there is a bilateral decrease of the proliferating cells in the SVZ and an increase in eutopic neuroblast migration through the RMS. These changes are possibly associated with a modification of the CSF, such as acidosis.
2. After this initial phase and during the chronic phase, there is an increase in SVZ proliferation and a recovery of eutopic neuroblast migration to basal levels.
3. Also, during the chronic phase, and induced by ischemia, a unilateral ectopic neuroblast migration to the peri-infarct zone is initiated. This migration is faster in the caudal area and slower in the rostral area of the brain.
4. Increased proliferation (reaching its maximum at 14 days) in combination with the potentiation of ectopic migration leads to a mayor number of the neural progenitors reaching the peri-infarct cortex and integrating as mature neurons.
5. In basal conditions, as well as in the chronic phase of stroke, the presence of TLR4 reduces the cell proliferation in the SVZ, which is manifested in a less eutopic neuroblast migration through its predefined route.
6. During the acute phase of cerebral ischemia there is a bilateral decrease in the number of proliferating cells in the SVZ. TLR4 is required for the maintenance of a larger number of proliferative cells in this area. The proliferation-activating effects are primarily exerted on activated type B cells possibly through TLR4 stimulation by ligands such as LPS and HMGB1.
7. Furthermore, TLR4 is involved in the maintenance and transient increase of eutopic neuroblast migration that occurs in the acute phase after stroke, possibly explaining the decrease in the number of type C cells observed.
8. *In vitro* specific activation of TLR4 in astrocytes by ligands like LPS and HMBG1 induces the expression of neurogenic mediators.
9. Accordingly, after *in vivo* ischemia, TLR4 is required to facilitate ectopic migration of neuroblasts following an ischemic process. TLR4 deficiency leads to a delay in the expression of neurogenic mediators, and a late resolution of inflammation in the peri-infarct area, consequently leading to a delay in the ectopic neuroblast migration to the damaged area described in the literature.

10. In summary, our data indicate that after cortical ischemia changes occur over time of the main stages of neurogenesis, so that, acting at the right time, an effective enhancement of this process could be performed to help the functional improvement. In addition, our data indicate that TLR4 is a promising target for the modulation of endogenous neurogenesis following stroke.

8.- BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA

1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med.* 333, 1581-7.
- Aarum, J., et al., 2003. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 15983-8.
- Adams, H.P., Jr., et al., 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 24, 35-41.
- Aksoy, E., et al., 2012. The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. *Nat Immunol.* 13, 1045-54.
- Albers, G.W., et al., 2011. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke.* 42, 2645-50.
- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124, 319-35.
- Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137, 433-57.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 22, 629-34.
- Amarenco, P., et al., 2009. New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis.* 27, 502-8.
- Androutsellis-Theotokis, A., et al., 2006. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature.* 442, 823-6.
- Arvidsson, A., Kokaia, Z., Lindvall, O., 2001. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci.* 14, 10-8.
- Arvidsson, A., et al., 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 8, 963-70.
- Asea, A., 2008. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 111-27.
- Astrup, J., et al., 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 8, 51-7.
- Astrup, J., Siesjö, B.K., Symon, L., 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 12, 723-5.
- Azari, H., et al., 2010. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp.*
- Bagley, J.A., Belluscio, L., 2010. Dynamic imaging reveals that brain-derived neurotrophic factor can independently regulate motility and direction of neuroblasts within the rostral migratory stream. *Neuroscience.* 169, 1449-61.
- Bakay, R.A., Sweeney, K.M., Wood, J.H., 1986. Pathophysiology of cerebrospinal fluid in head injury: Part 1. Pathological changes in cerebrospinal fluid solute composition after traumatic injury. *Neurosurgery.* 18, 234-43.
- Banizs, B., et al., 2005. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development.* 132, 5329-39.

- Barkho, B.Z., et al., 2008. Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells*. 26, 3139-49.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 271, C1424-37.
- Benraiss, A., et al., 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*. 21, 6718-31.
- Bose, A., et al., 2008. The Penumbra System: a mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol*. 29, 1409-13.
- Bowie, A., O'Neill, L.A., 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 67, 508-14.
- Bravo-Ferrer, I., et al., 2017. Cannabinoid Type-2 Receptor Drives Neurogenesis and Improves Functional Outcome After Stroke. *Stroke*. 48, 204-212.
- Brown, J., et al., 2003. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 17, 2042-6.
- Bsibsi, M., et al., 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 61, 1013-21.
- Cao, C.X., et al., 2007. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 353, 509-14.
- Caso, J.R., et al., 2007. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation*. 115, 1599-608.
- Codega, P., et al., 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*. 82, 545-59.
- Chen, S.T., et al., 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 17, 738-43.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci*. 8, 185-96.
- Choi, D.W., Rothman, S.M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 13, 171-82.
- Chou, D.K., et al., 2004. Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphotericin and sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration. *J Neurochem*. 90, 1389-401.
- Chow, J.C., et al., 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 274, 10689-92.
- Christie, K.J., Turnley, A.M., 2012. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci*. 6, 70.
- Dauphinee, S.M., Karsan, A., 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 86, 9-22.
- Davalos, A., et al., 2000. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology*. 54, 1568-74.
- Diez-Tejedor, E., et al., 2001. [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol*. 33, 455-64.
- Ding, S., 2014. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia. *Neural Regen Res*. 9, 2048-52.
- Doetsch, F., et al., 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 97, 703-16.
- Duncan, P.W., et al., 1992. Measurement of motor recovery after stroke. Outcome assessment and sample size requirements. *Stroke*. 23, 1084-9.
- Eriksson, P.S., et al., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4, 1313-7.

- Evans, M.D., Cooke, M.S., 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*. 26, 533-42.
- Faigle, R., Song, H., 2013. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1830, 2435-48.
- Fisher, M., Albers, G.W., 2013. Advanced imaging to extend the therapeutic time window of acute ischemic stroke. *Ann Neurol*. 73, 4-9.
- Folbergrova, J., et al., 1990. Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K⁺ and Ca²⁺. *J Neurochem*. 55, 1690-6.
- Font-Nieves, M., et al., 2012. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem*. 287, 6454-68.
- Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*. 201, 875-80.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*. 287, 1433-8.
- Gallucci, S., Matzinger, P., 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*. 13, 114-9.
- Garcia-Ovejero, D., et al., 2013. Neuroimmune interactions of cannabinoids in neurogenesis: focus on interleukin-1beta (IL-1beta) signalling. *Biochem Soc Trans*. 41, 1577-82.
- Gengatharan, A., Bammann, R.R., Saghatelian, A., 2016. The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Front Neurosci*. 10, 149.
- Gobin, Y.P., et al., 2004. MERCI 1: a phase 1 study of Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia. *Stroke*. 35, 2848-54.
- Gonzalez, F.F., et al., 2007. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci*. 29, 321-30.
- Gorina, R., et al., 2011. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*. 59, 242-55.
- Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 8, 481-8.
- Gundersen, H.J., et al., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96, 857-81.
- Hacke, W., 2015. Interventional thrombectomy for major stroke--a step in the right direction. *N Engl J Med*. 372, 76-7.
- Hakim, A.M., Shoubridge, E.A., 1989. Cerebral acidosis in focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1, 115-32.
- Hanger, C., et al., 2007. Improving care to stroke patients: adding an acute stroke unit helps. *N Z Med J*. 120, U2450.
- Hassan, F., et al., 2006. Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer*. 6, 281.
- Hayakawa, K., Qiu, J., Lo, E.H., 2010. Biphasic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 1207, 50-7.
- Hernandez-Jimenez, M., et al., 2013. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke*. 44, 2333-7.
- Hillered, L., Smith, M.L., Siesjo, B.K., 1985. Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 5, 259-66.
- Hoffmann, J.A., et al., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284, 1313-8.
- Hossmann, K.A., 2009. Pathophysiological basis of translational stroke research. *Folia Neuropathol*. 47, 213-27.
- Hossmann, K.A., 2012. The two pathophysiologicals of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32, 1310-6.

- Hurn, P.D., et al., 1995. Deferoxamine reduces early metabolic failure associated with severe cerebral ischemic acidosis in dogs. *Stroke*. 26, 688-94; discussion 694-5.
- Hurtado, O., et al., 2005. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis*. 18, 336-45.
- Husebye, H., et al., 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J*. 25, 683-92.
- Imitola, J., et al., 2004. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 18117-22.
- Iosif, R.E., et al., 2006. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 26, 9703-12.
- Iosif, R.E., et al., 2008. Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28, 1574-87.
- Iwai, M., et al., 2003. Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 331-41.
- Izaki, K., et al., 2001. Induction of mitochondrial heat shock protein 60 and 10 mRNAs following transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 88, 14-25.
- Jakubs, K., et al., 2008. Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J Neurosci*. 28, 12477-88.
- Jiang, W., et al., 2001. Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 32, 1201-7.
- Jin, K., et al., 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 4710-5.
- Jin, K., et al., 2006. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 13198-202.
- Jin, R., Yang, G., Li, G., 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 87, 779-89.
- Jolly, S.S., et al., 2015. Randomized trial of primary PCI with or without routine manual thrombectomy. *N Engl J Med*. 372, 1389-98.
- Jovin, T.G., et al., 2015. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med*. 372, 2296-306.
- Kagan, J.C., et al., 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 9, 361-8.
- Kahle, M.P., Bix, G.J., 2013. Neuronal restoration following ischemic stroke: influences, barriers, and therapeutic potential. *Neurorehabil Neural Repair*. 27, 469-78.
- Kaiser, O., et al., 2013. Dissociated neurons and glial cells derived from rat inferior colliculi after digestion with papain. *PLoS One*. 8, e80490.
- Kalaria, R.N., Akinyemi, R., Ihara, M., 2016. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia. *Biochim Biophys Acta*. 1862, 915-25.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11, 373-84.
- Kelly-Hayes, M., et al., 2003. The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 12, 119-26.
- Kempermann, G., Song, H., Gage, F.H., 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7, a018812.
- Kim, Y.M., et al., 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 452, 234-8.

- Koh, J.Y., Choi, D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*. 20, 83-90.
- Kokkola, R., et al., 2005. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol*. 61, 1-9.
- Kokovay, E., et al., 2012. VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*. 11, 220-30.
- Konstantinov, I.E., et al., 2004. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 19, 143-50.
- Kontos, H.A., 1985. George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res*. 57, 508-16.
- Kuan, C.Y., et al., 2004. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci*. 24, 10763-72.
- Kuge, A., et al., 2009. Temporal profile of neurogenesis in the subventricular zone, dentate gyrus and cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *Neurol Res*. 31, 969-76.
- Lalli, G., 2014. Extracellular signals controlling neuroblast migration in the postnatal brain. *Adv Exp Med Biol*. 800, 149-80.
- Lamonte, G., et al., 2013. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab*. 1, 23.
- Larrue, V., et al., 2001. Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II). *Stroke*. 32, 438-41.
- Lee, S.R., et al., 2006. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci*. 26, 3491-5.
- Lehtinen, M.K., et al., 2011. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*. 69, 893-905.
- Lei, C., et al., 2013. Effects of high-mobility group box1 on cerebral angiogenesis and neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Neuroscience*. 229, 12-9.
- Lei, C., et al., 2015. Activation of the high-mobility group box 1 protein-receptor for advanced glycation end-products signaling pathway in rats during neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 46, 500-6.
- Lei, C., et al., 2016. Brain recovery mediated by toll-like receptor 4 in rats after intracerebral hemorrhage. *Brain Res*. 1632, 1-8.
- Lemarchant, S., et al., 2012. tPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology*. 62, 749-56.
- Leow-Dyke, S., et al., 2012. Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *J Neuroinflammation*. 9, 230.
- Li, J., Lee, D.S., Madrenas, J., 2013. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. *Front Immunol*. 4, 347.
- Li, M., et al., 2014. High-mobility group box 1 released from astrocytes promotes the proliferation of cultured neural stem/progenitor cells. *Int J Mol Med*. 34, 705-14.
- Li, Q.Q., et al., 2015. Cortical neurogenesis in adult rats after ischemic brain injury: most new neurons fail to mature. *Neural Regen Res*. 10, 277-85.
- Lindvall, O., Kokaia, Z., 2015. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7.
- Lipscomb, D.C., et al., 1998. Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke*. 29, 487-92; discussion 493.
- Liu, J., et al., 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*. 18, 7768-78.

- Liu, K., et al., 2011. MiR-124 regulates early neurogenesis in the optic vesicle and forebrain, targeting NeuroD1. *Nucleic Acids Res.* 39, 2869-79.
- Liu, L., Duff, K., 2008. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J Vis Exp.*
- Liu, P.K., et al., 1996. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci.* 16, 6795-806.
- Liu, X.S., et al., 2013. MicroRNAs in cerebral ischemia-induced neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72, 718-22.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A., 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 264, 1145-8.
- Longa, E.Z., et al., 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20, 84-91.
- Lopes, R.S., et al., 2016. Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the subventricular zone and ischaemic striatum after focal ischaemia. *J Biosci.* 41, 381-94.
- Love, S., 1999. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9, 119-31.
- Macas, J., et al., 2006. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci.* 26, 13114-9.
- Manavalan, B., Basith, S., Choi, S., 2011. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol.* 2, 41.
- Marlier, Q., et al., 2015. Mechanisms and Functional Significance of Stroke-Induced Neurogenesis. *Front Neurosci.* 9, 458.
- Maroso, M., et al., 2010. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med.* 16, 413-9.
- Marshall, G.P., 2nd, et al., 2014. Microglia from neurogenic and non-neurogenic regions display differential proliferative potential and neuroblast support. *Front Cell Neurosci.* 8, 180.
- Marti-Fabregas, J., et al., 2010. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke: *Neurology* 2010;Vol.74:357-365. *Ann Neurosci.* 17, 134-5.
- McArthur, K.S., et al., 2011. Diagnosis and management of transient ischaemic attack and ischaemic stroke in the acute phase. *BMJ.* 342, d1938.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 388, 394-7.
- Meng, C., et al., 2015. Inhibition of interleukin-6 abolishes the promoting effects of pair housing on post-stroke neurogenesis. *Neuroscience.* 307, 160-70.
- Ming, G.L., Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron.* 70, 687-702.
- Minger, S.L., et al., 2007. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med.* 2, 69-74.
- Minnerup, J., et al., 2012. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 13, 11753-72.
- Mittal, D., et al., 2010. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *EMBO J.* 29, 2242-52.
- Miyake, K., 2004. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol.* 16, 11-6.
- Moraga, A., et al., 2014. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* 28, 4710-8.
- Moraga, A., et al., 2016. Imaging the role of toll-like receptor 4 on cell proliferation and inflammation after cerebral ischemia by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36, 702-8.

- Morales, A.V., et al., 1998. Heat shock proteins in retinal neurogenesis: identification of the PM1 antigen as the chick Hsc70 and its expression in comparison to that of other chaperones. *Eur J Neurosci.* 10, 3237-45.
- Mutch, W.A., Hansen, A.J., 1984. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 4, 17-27.
- Nagai, Y., et al., 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 3, 667-72.
- Nam, S.C., et al., 2007. Dynamic features of postnatal subventricular zone cell motility: a two-photon time-lapse study. *J Comp Neurol.* 505, 190-208.
- Nativel, B., et al., 2013. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS One.* 8, e76039.
- Netea, M.G., Wijmenga, C., O'Neill, L.A., 2012. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol.* 13, 535-42.
- O'Collins, V.E., et al., 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol.* 59, 467-77.
- O'Donnell, M.J., et al., 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 376, 112-23.
- Obernier, K., et al., 2011. Expression of Tlx in both stem cells and transit amplifying progenitors regulates stem cell activation and differentiation in the neonatal lateral subependymal zone. *Stem Cells.* 29, 1415-26.
- Ohab, J.J., Carmichael, S.T., 2008. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist.* 14, 369-80.
- Park, B.S., et al., 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 458, 1191-5.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., Doetsch, F., 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 6387-92.
- Patel, A.R., et al., 2013. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 5, 73-90.
- Poltorak, A., et al., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 282, 2085-8.
- Ponti, G., et al., 2013. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, E1045-54.
- Pradillo, J.M., et al., 2009. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem.* 109, 287-94.
- Pradillo, J.M., et al., 2016. Reparative effects of interleukin-1 receptor antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia. *Brain Behav Immun.*
- Pulsinelli, W., 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet.* 339, 533-6.
- Qiu, J., et al., 2008. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 927-38.
- Qiu, J., et al., 2010. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke.* 41, 2077-82.
- Rajdev, S., et al., 2000. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol.* 47, 782-91.
- Ramón y Cajal, S., 1928. Degeneration & regeneration of the nervous system. Oxford University Press.
- Ribeiro Xavier, A.L., et al., 2015. A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone. *J Neurosci.* 35, 11848-61.
- Robin, A.M., et al., 2006. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 125-34.

- Rolls, A., et al., 2007. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol.* 9, 1081-8.
- Russo, I., Barlati, S., Bosetti, F., 2011. Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. *J Neurochem.* 116, 947-56.
- Sacco, R.L., et al., 1997. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke.* 28, 1507-17.
- Saha, R.N., Pahan, K., 2006. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal.* 8, 929-47.
- Sandoval, K.E., Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 32, 200-19.
- Saver, J.L., et al., 2015. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med.* 372, 2285-95.
- Schuster, A., et al., 2014. Maintenance of the enteric stem cell niche by bacterial lipopolysaccharides? Evidence and perspectives. *J Cell Mol Med.* 18, 1429-43.
- Shimazu, R., et al., 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 189, 1777-82.
- Siesjo, B.K., Agardh, C.D., Bengtsson, F., 1989. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1, 165-211.
- Sorci, G., et al., 2013. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1833, 101-9.
- Sousa, R.M., et al., 2009. Contribution of chronic diseases to disability in elderly people in countries with low and middle incomes: a 10/66 Dementia Research Group population-based survey. *Lancet.* 374, 1821-30.
- Sun, Y., et al., 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest.* 111, 1843-51.
- Sutherland, B.A., et al., 2012. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke.* 7, 407-18.
- Szele, F.G., Chesselet, M.F., 1996. Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J Comp Neurol.* 368, 439-54.
- Takaki, E., et al., 2006. Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem.* 281, 4931-7.
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140, 805-20.
- Tanimura, N., et al., 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 368, 94-9.
- Terent, A., et al., 2009. Stroke unit care revisited: who benefits the most? A cohort study of 105,043 patients in Riks-Stroke, the Swedish Stroke Register. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 80, 881-7.
- Thored, P., et al., 2006. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells.* 24, 739-47.
- Tobin, M.K., et al., 2014. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34, 1573-84.
- Urra, X., et al., 2015. Mechanical Thrombectomy in and Outside the REVASCAT Trial: Insights From a Concurrent Population-Based Stroke Registry. *Stroke.* 46, 3437-42.
- Vabulas, R.M., et al., 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem.* 276, 31332-9.
- Vallieres, L., et al., 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci.* 22, 486-92.
- Vescovi, A.L., Galli, R., Reynolds, B.A., 2006. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 6, 425-36.

- Visintin, A., et al., 2005. Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. *J Immunol.* 175, 6465-72.
- Waage, A., et al., 1989. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med.* 169, 333-8.
- Walker, T.L., et al., 2013. Prominin-1 allows prospective isolation of neural stem cells from the adult murine hippocampus. *J Neurosci.* 33, 3010-24.
- Wang, C., et al., 2011. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534-50.
- Wang, L., et al., 2014. HMGB1 enhances embryonic neural stem cell proliferation by activating the MAPK signaling pathway. *Biotechnol Lett.* 36, 1631-9.
- Wang, Y., He, H.J., Ouyang, W., 2013. Increased expression of toll-like receptor 4 on neurons after surgery in aged rats. *CNS Neurosci Ther.* 19, 358-60.
- WHO, 1988. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol.* 41, 105-14.
- Wu, H., et al., 2010. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 21, 1878-90.
- Wu, M.D., et al., 2013. Sustained IL-1 β expression impairs adult hippocampal neurogenesis independent of IL-1 signaling in nestin⁺ neural precursor cells. *Brain Behav Immun.* 32, 9-18.
- Yamashita, T., et al., 2006. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 26, 6627-36.
- Yan, Y.P., et al., 2007. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1213-24.
- Yang, H.Z., et al., 2012. TLR4 activity is required in the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis after acute and chronic lung injury. *Am J Pathol.* 180, 275-92.
- Yao, L., et al., 2013. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J Neuroinflammation.* 10, 23.
- Ye, Y., et al., 2014. Association between toll-like receptor 4 expression and neural stem cell proliferation in the hippocampus following traumatic brain injury in mice. *Int J Mol Sci.* 15, 12651-64.
- Yu, M., et al., 2006. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock.* 26, 174-9.
- Zhang, R., et al., 2004. Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci.* 24, 5810-5.
- Zhang, R.L., et al., 2001. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 105, 33-41.
- Zhang, R.L., et al., 2006. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 857-63.
- Zhang, R.L., et al., 2007. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci.* 27, 3157-62.
- Ziv, Y., et al., 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 9, 268-75.

9.- ANEXO

9.-ANEXO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular.....	Página 4
Figura 1.2. Representación esquemática de la cascada isquémica.	Página 7
Figura 1.3. Representación gráfica de las zonas neurogénicas del cerebro adulto.....	Página 13
Figura 1.4. Esquema de las etapas de la neurogénesis adulta en la ZSV, los principales tipos celulares neurales y los marcadores utilizados para su caracterización.	Página 15
Figura 1.5. Esquema de la migración de neuroblastos generados en la ZSV en condiciones fisiológicas y tras una isquemia experimental cortical.	Página 18
Figura 1.6. Clasificación de los TLRs en función de las vías de señalización intracelular que activan.	Página 24
Figura 1.7. Estructura cristalina de TLR4 e interacción con su principal ligando LPS.....	Página 26
Figura 1.8. Regulación de las vías pro- y anti-inflamatorias activadas por TLR4.....	Página 27
Figura 3.1. Modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media y grupos experimentales.....	Página 41
Figura 3.2. Esquema de la localización de la cisterna magna y lugar de inyección para la extracción de LCR en un ratón adulto.....	Página 44
Figura 3.3. Representación esquemática de la cuantificación de las células Ki67 ⁺ en la ZSV.....	Página 48
Figura 3.4. Representación esquemática de la cuantificación de las células pHis3 ⁺ en la ZSV y parámetros empleados para el conteo estereológico.....	Página 49
Figura 3.5. Representación esquemática de las zonas de cuantificación de los neuroblastos (células DCX ⁺).....	Página 52
Figura 3.6. Esquema representativo de los ensayos de migración en el sistema Transwell®.....	Página 55
Figura 3.7. Representación esquemática de la cuantificación de neuroblastos migrados en el sistema Transwell®.....	Página 56
Figura 3.8. Esquema representativo de las zonas analizadas para el estudio de diferenciación neuronal en la corteza ipsilesional.....	Página 58

Figura 4.1. Protocolo experimental para el estudio del perfil temporal de la neurogénesis en la ZSV.....	Página 63
Figura 4.2. Porcentaje de hemisferio infartado 48 horas tras la isquemia experimental.	Página 64
Figura 4.3. Efecto de la isquemia cerebral en el número de células en proliferación en la ZSV a lo largo del tiempo.....	Página 65
Figura 4.4. Efecto de la isquemia cerebral en el volumen de la ZSV a lo largo del tiempo.	Página 67
Figura 4.5. Medidas de pH en plasma y LCR tras una isquemia cortical experimental...Página 67	
Figura 4.6. Espectros de RMN-Metabolómica del LCR.....	Página 68
Figura 4.7. Efecto de la isquemia en la migración eutópica de los neuroblastos desde la ZSV al BO a través de la RMR.....	Página 69
Figura 4.8. Efecto de la isquemia experimental en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona rostral.....	Página 71
Figura 4.9. Efecto de la cirugía (animales <i>sham</i>) en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona rostral.....	Página 72
Figura 4.10. Efecto de la isquemia experimental en la migración ectópica de neuroblastos desde la ZSV al área dañada a través de la zona caudal.....	Página 73
Figura 4.11. Diferenciación neuronal de las células que proliferan durante la primera semana de una isquemia experimental.....	Página 75
Figura 4.12. Diferenciación neuronal de las células que proliferan durante la segunda y tercera semana de una isquemia experimental.....	Página 76
Figura 4.13. Diseño experimental y análisis del infarto cerebral.....	Página 78
Figura 4.14. Análisis temporal de la proliferación en la ZSV tras isquemia experimental en ratones TLR4 ^{+/+} y TLR4 ^{-/-}	Página 79
Figura 4.15. Regresiones lineales que muestran la correlación entre el % de hemisferio infartado y el volumen de Ki67.....	Página 80
Figura 4.16. Efecto de TLR4 en la proliferación de la ZSV tras una isquemia experimental en animales con tamaño de infarto similar.....	Página 81
Figura 4.17. Efecto de TLR4 y del volumen de infarto en la proliferación en la ZSV tras una isquemia experimental.....	Página 82
Figura 4.18. Efecto de la activación de TLR4 sobre la proliferación de CMNs adultas...Página 83	

Figura 4.19. Efecto de TLR4 en el estado proliferativo de las CMNs y CPNs presentes en la ZSV 24 horas tras una isquemia experimental.....	Página 84
Figura 4.20. Efecto de TLR4 en el porcentaje de células de tipo B activadas y células de tipo C en la ZSV 24 horas tras isquemia experimental.....	Página 85
Figura 4.21. Efecto de TLR4 en la migración basal de los neuroblastos a través de la RMR.....	Página 86
Figura 4.22. Efecto de TLR4 en la migración eutópica de los neuroblastos a través de la RMR en la fase aguda de una isquemia experimental.....	Página 87
Figura 4.23. Protocolo experimental para el estudio del mecanismo de migración de neuroblastos.....	Página 88
Figura 4.24. Efecto de la cirugía en la expresión de ARNm de distintos mediadores neurogénicos.....	Página 89
Figura 4.25. Perfil temporal de la expresión de ARNm de IL-6 y MCP-1.....	Página 89
Figura 4.26. Perfil temporal de la expresión de ARNm de SDF-1 α y BDNF.....	Página 90
Figura 4.27. Perfil temporal de la expresión de ARNm de VEGF-A y IL-1 β	Página 91
Figura 4.28. Perfil temporal de la expresión de ARNm de MMP-9.....	Página 91
Figura 4.29. Perfil temporal de la expresión de mediadores neurogénicos tras la activación específica de TLR4 en cultivo celular de astrocitos.....	Página 93
Figura 4.30. Esquema representativo de los ensayos de migración realizados mediante el sistema <i>in vitro</i> Transwell®.....	Página 94
Figura 4.31. Puesta a punto del ensayo de migración de neuroblastos con el sistema Transwell®.....	Página 95
Figura 4.32. Efecto directo, indirecto y total de la activación de TLR4 con LPS sobre la migración de neuroblastos.....	Página 96
Figura 4.33. Efecto de LPS sobre la expresión de ARNm de iNOS y COX2 y sobre la viabilidad de las CMNs.....	Página 97
Figura 4.34. Efecto directo, indirecto y total de HMGB1 sobre la migración de neuroblastos.....	Página 98
Figura 4.35. Perfil temporal de la expresión de mediadores neurogénicos tras el tratamiento de los astrocitos con HMGB1.....	Página 99

Figura 5.1. Esquema de los principales tipos celulares y marcadores utilizados para su caracterización.....	Página 112
--	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los factores de riesgo que incrementan el riesgo de sufrir un ictus.....	Página 2
Tabla 2. Principales causas del fallo en la traslacionalidad a la clínica de los potenciales agentes neuroprotectores ensayados para la fase aguda del ictus isquémico.....	Página 11
Tabla 3. Principales ligandos (DAMPs y PAMPs) para cada TLR.....	Página 23
Tabla 4. Resumen de los compuestos testados en los experimentos <i>in vitro</i>	Página 39
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para los experimentos proliferación mediante citometría de flujo.....	Página 50
Tabla 6. Secuencias de los cebadores directos e inversos de IL-6, MCP-1, SDF-1 α , BDNF, VEGF-A, IL-1 β , MMP-9 y el control de normalización GAPDH para RT-qPCR, todos ellos específicos de ratón.....	Página 54
Tabla 7. Descripción de los parámetros obtenidos en la cuantificación estereológica de células pHis3 ⁺	Página 66